

Entwicklung von DNA-basierten Multichromophoren und Donor-Akzeptor Systemen zur Untersuchung des Ladungstransfers in DNA

Zur Erlangung des
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV — Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



DISSERTATION

von

Diplom-Chemiker

Janez Barbarič

aus Regensburg

Regensburg, 2008

Diese Arbeit wurde angeleitet durch Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht.

Promotionsgesuch eingereicht am: 7. November 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2008

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Arno Pfitzner (Vorsitzender)

Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Prof. Dr. Burkhard König

Prof. Dr. Rainer Winter

Meinen Eltern und Melanie

***„Weisheit ist nicht das Ergebnis der Schulbildung,
sondern des lebenslangen Versuchs, sie zu erwerben.“
(Albert Einstein)***

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2005 bis September 2005 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München und von Oktober 2005 bis November 2008 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht danke ich für die hervorragende Betreuung, die immer genug Platz für eigene Initiative ließ ohne dabei das Ziel aus den Augen zu verlieren.

Speziell möchte ich mich bedanken bei:

- meinen münchner Laborkollegen Dr. Elke Mayer-Enthart, Dr. Clemens Wagner, Dr. Linda Valis, Peter Kaden, Dr. Manuela Rist für die sehr gute Zusammenarbeit in einer unglaublichen Laboratmosphäre, in der wir auch viel Spass hatten.
- meinen regensburger Kollegen Daniela Baumstark, Sina Berndl, Christoph Beyer, Ulrike Bruckner, Thomas Ehrenschwender, Martin Ehrhard, Nadine Herzig, Daniel Lachmann, Florian Menacher, Christa Prunkl, Veronika Rödl, Moritz Rubner, Wolfgang Schmucker, Dr. Reji Varghese, und Dr. Claudia Wanninger-Weiß für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit.
- Christoph, Daniela, Linda, Martin, Sina, Wolfgang für die wissenschaftliche, musikalische und fröhliche Arbeitsatmosphäre, in der wir sehr viel Spaß hatten und manchen Frust von der Seele tranken.
- Ulrike Weck für ihre stete Unterstützung in organisatorischen Dingen.
- meinen Praktikanten die fleißig gekocht haben und immer mit Herz bei der Sache waren.
- Dr. Simone Peters für die wissenschaftlichen Diskussionen über die M-DNA.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der Regensburger NMR-Abteilung für die Messung und Interpretation der NMR-Spektren.
- Josef Kiermaier und Wolfgang Söllner der Zentralen Analytik für die Anfertigung der Massenspektren.
- Dr. Torsten Fiebig und seinen Mitarbeitern für die zeitaufgelösten Transientenabsorptionsmessungen und die wissenschaftlichen Diskussionen.
- Burghard Cordes für die unzähligen ESI-MS-Spektren, die sofort gemessen wurden.
- den Mitgliedern des Arbeitskreises Kessler für ihre Unterstützung.

Sollte ich jemanden vergessen haben, so möchte ich mich dafür entschuldigen und betonen, dass es ein Versehen gewesen sein muss. Auf jeden Fall sage ich „Danke!“

Mein besonderer Dank gilt Melanie, die mit ihrer Geduld sowohl bei einsamen Wochenenden und Korrekturlesen meine Arbeit unterstützt hat und mir stets zur Seite stand und mich auf dem „Boden“ hielt.

Einige Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Ultrafast Energy Transfer and Structural Dynamics in DNA

A. Trifonov, M. Raytchev, I. Buchvarov, M. Rist, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19490-19495.

DNA as a supramolecular scaffold for the helical arrangement of a stack of 1-ethynylpyrene chromophore

J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2088-2090.

Helical self-assembled chromophore clusters based on DNA-like architecture

E. Mayer-Enthart, C. Wagner, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3434-3439.

Indole in DNA: Comparison of a nucleosidic with a non-nucleosidic DNA base substitution

J. Barbaric, C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.*, submitted **2008**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Themenstellung.....	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Ladungstransfer in DNA	3
2.1.1	Oxidativer Lochtransfer	5
2.1.1.1	Biologische Bedeutung	5
2.1.1.2	Mechanistische Modelle für den oxidativen Lochtransfer und –transport	7
2.1.1.3	Bisherige Studien zum oxidativen Lochtransfer und -transport	11
2.1.2	Reduktiver Elektronentransfer und -transport.....	14
2.1.2.1	Biologische Relevanz des reduktiven Elektronentransfers und -transportes	15
2.1.2.2	Mechanismen	17
2.1.2.3	γ -Puls-Radiolyse-Experimente.....	17
2.1.2.4	Photoinduzierter Elektronentransfer und -transport.....	18
2.1.3	Ethidium als Loch- und Ladungsdonor.....	25
2.2	Experimentelle Methoden zur Untersuchung des photoinduzierten Ladungs- transfers in DNA.....	28
2.2.1	Optische Spektroskopie.....	28
2.2.2	Cyclovoltammetrie und Spektroelektrochemie	32
2.3	Synthetische Methoden	33
2.3.1	DNA-Synthese	33
2.3.2	Click-Chemie	35
2.3.3	Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen	36
2.4	Tryptophan als biologischer Lochakzeptor	38
2.5	SNP-Detektion	41
2.5.1	Hybridisierungsmethoden	42
2.5.2	Enzymatische Methoden.....	44
2.5.3	Chemische Ligation und Chemische Primer Extension	47
2.5.4	DETEQ-Konzept.....	47
2.6	M-DNA	49
2.7	DNA-basierte Multichromophorstapel	53
3	Ladungstransfer in Oligonukleotiden	58

3.1	Indolmodifizierte Oligonukleotide.....	58
3.1.1	Hintergrund	58
3.1.2	Synthese des indolmodifizierten β -Nukleosids und des entsprechenden Phosphoramidits	59
3.1.3	Spektroskopische Untersuchungen des 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indols	62
3.1.4	Darstellung der indolmodifizierten Oligonukleotide	63
3.1.5	Spektroskopische Untersuchung der indolmodifizierten DNA	64
3.2	Ethidium- und indolmodifizierte Oligonukleotide als Donor-Akzeptor-System.....	68
3.2.1	Synthese des Ethidium-Phosphoramidits.....	69
3.2.2	Darstellung und Charakterisierung der ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotide.....	71
3.2.3	Entwicklung eines <i>Molecular Beacons</i> auf Ethidium- und Indol-Basis	75
3.3	Indolsulfonamidmodifiziertes Oligonukleotid	78
3.3.1	Hintergrund	78
3.3.2	Spektroskopische Untersuchungen des 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-Desoxy- β -D- ribofuranosyl)-indols.....	80
3.3.3	Darstellung des indolsulfonamidmodifizierten Oligonukleotides	81
3.3.4	Untersuchungen zum Ladungstransfer in einer Indolsulfonamid-DNA	82
3.4	Zusammenfassung.....	84
4.	Untersuchungen zum reduktiven Elektronentransfer im metallkoordinierten DNA-System	86
4.1	Hintergrund	86
4.2	Synthese des phenothiazinmodifizierten Nukleosids.....	88
4.3	Synthese der phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierten DNA.....	90
4.4	Darstellung und Charakterisierung der M-DNA.....	91
4.5	Untersuchungen zum Elektronentransfer	93
4.6	Zusammenfassung.....	94
5.	Entwicklung neuer DNA-basierter Fluoreszenzsonden.....	96
5.1	Synthese des Pyrenylethynyl-Phosphoramidits und dessen Oligonukleotide	98
5.2	Ein- bis fünffach Py \equiv -dU-modifizierte Oligonukleotide.....	100
5.3	Fehlgepaarte Duplexe mit fünffach Py \equiv -dU-modifizierten Oligonukleotiden.....	108
5.4	Zehnfach Py \equiv -dU-modifiziertes Oligonukleotid.....	111

5.5 Zusammenfassung.....	114
6. Zusammenfassung.....	116
7. Materialien und Methoden.....	118
7.1 Allgemeines.....	118
7.2. Durchführung und Auswertung der Bestrahlungsexperimente.....	123
7.2.1 Bestrahlung und Piperidinbehandlung von phenothiazin-, thiouridin- und brom- uridinmodifizierten Duplexen.....	123
7.2.2 Bestrahlung des indolsulfonamidmodifizierten Nukleosids bzw. –Duplexes.....	124
7.2.2.1 Photochemische Entschützung des 1-Phenylsulfonyl-3-(2`-desoxy-β-D- ribofuranosyl)-indols.....	124
7.2.2.2 Photochemische Entschützung des indolsulfonamidmodifizierten Duplexes	124
7.3 Synthesen	125
7.3.1 Darstellung des Indol-Phosphoramidits	125
7.3.2 Darstellung des Ethidium-Phosphoramidits.....	133
7.3.3 Darstellung des Phenothiazin-Phosphoramidits	139
7.3.4 Darstellung des Pyren-Phosphoramidits	143
7.4 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden.....	146
7.4.1 Allgemeines.....	146
7.4.2 Verwendete Oligonukleotidsequenzen.....	150
7.4.3 Synthese und Charakterisierung von indolmodifizierten Oligonukleotiden.....	153
7.4.4 Synthese und Charakterisierung von ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotiden	154
7.4.5 Synthese und Charakterisierung von phenothiazin-, thiouridin- und bromuridin- modifizierten Oligonukleotiden	154
7.4.6 Synthese und Charakterisierung von Py≡-dU-modifizierten Oligonukleotiden.....	155
8 Literaturverzeichnis.....	156

Abkürzungsverzeichnis

A	Akzeptor, Adenin
Å	Angström
<i>Alloc</i>	Allyloxycarbonyl
abs.	absolut
ber.	berechnet
bp	basenpaare
Br-dU	5-Brom-2'-desoxyuridin
bzgl.	bezüglich
ca.	<i>circa</i>
bzw.	beziehungsweise
CD	Zirkularerdichroismus
CPG	<i>Controlled Pore Glas</i>
CT	Ladungstransfer (<i>Charge Transfer</i>)
δ	chemische Verschiebung
D	Donor
D	Dublett, Tag
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromotagraphie
DCM	Dichlormethan
dest. H ₂ O	destilliertes und entionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl-
DMTCI	4,4'-Dimethoxytritylchlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

conc.	konzentriert
CV	Cyclovoltammetrie
dppf	[1,1'-Bis(diphenylphosphin)-ferrocen]-palladium(II)-chlorid
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
dU	2'-Desoxyuridin
E ₀₀	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
E ⁰	Energie
EE	Essigsäureester
EI	elektrische Ionisation
E _{ox}	Oxidationspotential
E _{ox} [*]	Oxidationspotential des angeregten Zustands
eq.	Äquivalent
E _{red}	Reduktionspotential
E _{red} [*]	Reduktionspotential des angeregten Zustands
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
<i>et al.</i>	und weitere (<i>et alii</i>)
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
exc	Anregung (<i>Excitation</i>)
FAD	Flavinadenindinucleotid
FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
fs	Femtosekunde
gem.	gemessen

gg.	gegebenfalls
G ^{ox}	Oxidationsprodukte des Guanins
Hex	Hexan
h	Stunde
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HMBC	<i>HeteronuclearMultipleBond Coherence</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectroscopy</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
Lys	Lysin
λ	Wellenlänge
M	Molar
M	Multipllett
mdeg	<i>Millidegree</i>
m/z	Verhältnis Masse zur Ladung
MALDI-TOF-MS	Matrix unterstützte Flugzeit-Massenspektroskopie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
μm	Mikrometer

M-DNA	metallionenhaltige DNA
MS	Massenspektroskopie
Na-P _i	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
ns	Nanosekunde
NWE	Normalwasserstoffelektrode
OD	Optische Dichte
ON	Oligonukleotid
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
ps	Pikosekunde
Py	Pyren(yl)
Py≡-dU	5-(1-Ethynylpyrenyl)-2'-desoxyuridin
Py≡	1-Ethynylpyren(yl)
Pz-dU	5-(10-Methylphenothiazim-3-yl)-2'-desoxyuridin
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
S	Singulett
s.	siehe
SEC	Spektroelektrochemie
SNP	Einzelbasen-Punktmutation (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
sog.	Sogenanntes

ss	Einzelstrang
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
Thio-dU	2'-Desoxy-4-thiouridin
TMS	Trimethylsilan
TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
ÜS	Überschuß
u.a.	unter anderem
UV/ Vis	Ultraviolett und sichtbares Spektrum (190 – 800 nm)
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Die in dieser vorliegenden Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*² empfohlenen Richtlinien. Englische Fachbegriffe wurden kursiv geschrieben.

¹*Chemical Abstracts*, Index Guide, 77

²a) *IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC)* und *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)*, *Biochem.* **1971**, 10, 3983-4004.

b) *IUPAC-IUB (CBN)*, Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477.

1. Einleitung und Themenstellung

Nukleinsäuren wurden erstmals 1871 von *Friedrich Miescher* aus Zellkernen isoliert. Daher ihr Name (*Nucleus* = Kern). Im Jahr 1944 konnte *Avery* nachweisen, dass die Nukleinsäure der Träger (DNA) der genetischen Information ist.^[1] 1953 wurde ihr Aufbau und ihre Funktion von *Watson* und *Crick* aufgeklärt.^[2] Damals konnte niemand die Tragweite dieser Entdeckung abschätzen. Binnen eines halben Jahrhunderts entwickelte sich die moderne Molekularbiologie zu einer Hochtechnologie. Ein weiterer Meilenstein konnte 2001 verbucht werden, als das gesamte menschliche Genom aufgeklärt und kartiert wurde.^[3] Mit dem Fortschritt der modernen Molekularbiologie ist es z. B. heute eine Selbstverständlichkeit, DNA synthetisch herzustellen und sie zu modifizieren.^[5-9] Die Ziele dieser Entdeckungen sind, nicht nur neue Erkenntnisse über genetisch bedingte Erkrankungen wie Tumore zu gewinnen, sondern sie auch in der Diagnostik und bei der Behandlung dieser Krankheiten anzuwenden.

Bereits kurz nach der Aufklärung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick* wurde aufgrund der ausgeprägten π - π -Wechselwirkungen der aromatischen DNA-Basen über die Möglichkeit eines Ladungstransportes entlang der Helixachse diskutiert.^[10] Das Interesse an Ladungstransferprozessen in DNA stieg mit der Erkenntnis, dass die oxidativen Schädigungen unseres Erbgutes zu möglichen Folgen wie Mutationen, Apoptose oder die Entstehung von Krebserkrankungen führen.^[11-13] Bei der Erforschung des oxidativen Lochtransfers wurde festgestellt, dass das Auftreten von radikalischer Ladung in DNA durch ionisierende Strahlung, Alkylierungs- oder Oxidationsmittel verursacht wird. Inzwischen ist der Mechanismus des Lochtransfers weitestgehend geklärt.^[14] Über die biologische Bedeutung des verwandten Prozesses, dem reduktiven Elektronentransfers, durch die DNA, wird weiter geforscht. Man vermutet z.B. eine Beteiligung von Elektronentransferprozessen bei der proteinabhängigen Erkennung von DNA-Schäden. Nur bei der Reparatur der Thymin-Thymin-Dimere durch die DNA-Photolyase, ist die Beteiligung des reduktiven Elektronentransfers gut untersucht. Diese findet allerdings nur zwischen DNA und Proteinen und nicht DNA-vermittelt statt.^[15-17] Die Erforschung des reduktiven Elektronentransfers wurde erst seit dem Jahr 2000 intensiv vorangetrieben. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse lassen sich heute bereits in der Analytik einsetzen. So wird der reduktive Elektronentransfer bei der Entwicklung von empfindlichen DNA-Sensoren und -Chips^[18-21] genutzt und es können damit Punktmutationen und DNA-Schäden unabhängig von deren benachbarten Basensequenzen nachgewiesen werden. Die Detektion von SNP-Stellen ist für die Onkologie, Genetik, Virologie und Pharmakogenetik von großer Bedeutung.^[22,23]

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Ladungstransfer durch DNA mithilfe synthetisch modifizierten Nukleosiden und Nukleosidanaloga. Diese werden als Ladungsdonor bzw.

-akzeptor in die DNA eingebaut, um den Ladungstransfer zu untersuchen. Die zu behandelten Fragestellungen teilen sich in drei Gebiete:

- Im ersten Teil wird ein Indol-Nukleosid synthetisiert in die DNA eingebaut und spektroskopisch charakterisiert. Anschließend wird dieses Indol-Nukleosid als Lochakzeptor als DETEQ-Sonde (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) eingesetzt und dessen Eignung für die Detektion der Basenfehlpaarungen untersucht. Als Donor wird ein Ethidium-Nukleosidanalogon^[24,25] verwendet, das in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelt wurde. Beide, Ethidium- und Indol-Nukleosidanaloga, Chromophore sind über einen Glycol-Linker,^[26] der in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde, in die DNA eingebaut. Es soll ein photoinduzierter Ladungstransfer zwischen Donor und Akzeptor über maximal drei Basenpaare beobachtet werden und der Einfluß von Basenfehlpaarungen untersucht werden.

- Im zweiten Teil wird die Effizienz des reduktiven Elektronentransfers in metallhaltiger DNA in Form von Strangbruchexperimenten untersucht. Als photoinduzierbarer Elektronendonator wird Phenothiazin-dU verwendet, das in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelt wurde. Als Elektronenakzeptor wird das kommerziell erhältliche Br-dU verwendet. Als metallvermittelte Basenpaar wird Thio-dU verwendet in Gegenwart von Ag(I)-Ionen. In Vorarbeiten konnte mit Pz-dU als Elektronendonator und Br-dU als Elektronenakzeptor in nativer DNA gezeigt werden, dass der Elektronentransfer über A-T-Basenpaare und in 3'→5' Richtung effektiver ist. Dieses Experiment soll an metallhaltiger DNA erprobt werden.

- Im letzten Teil werden neue molekulare, multichromophore Fluoreszenzsonden entwickelt. Basierend auf dem Py≡-dU-Nukleosid sollen mehrere Py≡-dU-Einheiten unmittelbar aufeinander folgend in Oligonukleotide eingebaut werden und spektroskopisch untersucht werden. Mit diesem Multichromophor-DNA-System sollen neue Fluoreszenzeigenschaften erzeugt werden.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Ladungstransfer in DNA

Schon Eley und Spivey vermuteten, dass die koplanare und regelmäßige Anordnung der Basenpaare (π -Stapelung) in der DNA einen Ladungstransfer ermöglichen sollte.^[29-31] Heute besteht kein Zweifel mehr daran, dass DNA in der Lage ist, Ladung zu übertragen. Prinzipiell können Ladungstransferprozesse als oxidativer Lochtransfer oder reduktiver Elektronentransfer interpretiert werden. Das Auftreten dieser Prozesse hängt von der relativen energetischen Lage der Orbitale ab. Die Zusammenhänge sind in der Abbildung 2-1 veranschaulicht.

Beim oxidativen Lochtransfer wird die DNA oxidiert. Ein Elektron wird vom photoangeregten Donor (D^*) aus der DNA abgefangen oder vom Akzeptor (A) aufgenommen und ein Radikalkation, d. h. ein Elektronenloch, wird im Basenstapel erzeugt.

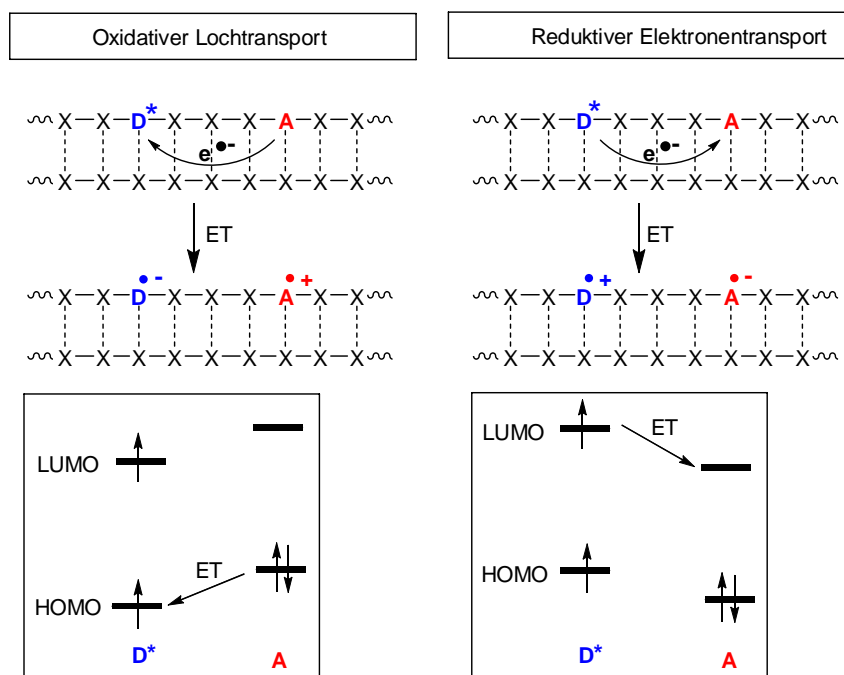


Abbildung 2-1: Beim **oxidativen Lochtransfer** wird ein Elektron aus dem HOMO des Ladungsakzeptors A in das HOMO des angeregten Ladungsdonors überführt. Beim **reduktiven Ladungstransfer** wird ein Elektron aus dem LUMO des angeregten Ladungsdonors D^* in das LUMO des Ladungsakzeptors A überführt.

Beim reduktiven Elektronentransfer wird ein Elektron des angeregten Chromophors (D^*) in die DNA injiziert oder auf den Akzeptor übertragen. Chemisch betrachtet wird die DNA reduziert.

Diese Elektroneninjektion ist Ausgangspunkt für einen reduktiven Elektronentransfer durch die DNA.

Für die Untersuchung des photoinduzierten Ladungstransfers ist eine kovalente Modifikation der DNA mit redoxaktiven Sonden zu markieren. Dies kann nach folgenden Methoden erfolgen (s. Abbildung 2-2):

- i) Einbau des Ladungsdonors als artifizielle Nukleobase. Diese ersetzt DNA-Basen und sind über eine Desoxyriboseeinheit oder einer Linkereinheit mit der DNA kovalent verknüpft. Idealerweise sind sie in den Basenstapel interkaliert.
- ii) Einbau der Ladungsdonoren als Modifikationen natürlicher Nukleoside. Dies erfolgt meist über eine automatisierte DNA-Festphasensynthese. Je nach Modifikation kann dieses Chromophor sowohl in den Basenstapel interkaliert sein oder in die große Furche ragen.
- iii) Platzierung der Ladungsdonoren über eine Linkereinheit als Kopfgruppe einer DNA-Haarnadel.
- iv) Verknüpfung der Ladungsdonoren am 3`- oder 5`-Terminus der Oligonukleotide.

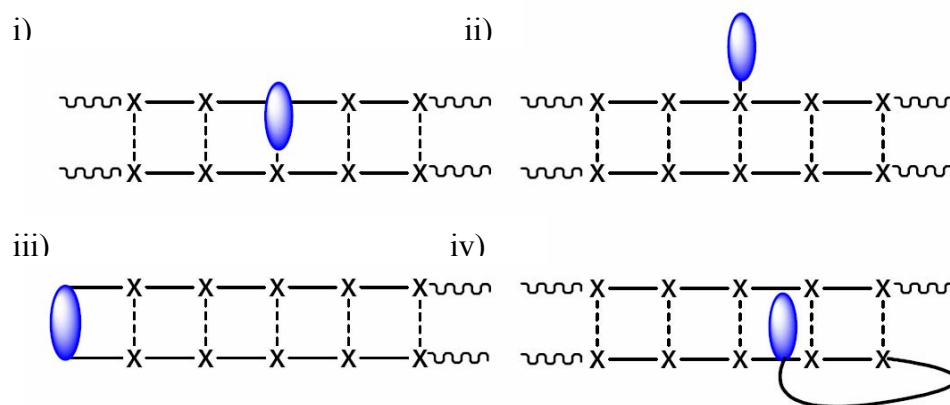
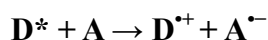


Abbildung 2-2: Prinzipielle Varianten der Modifikation von DNA mit redoxaktiven Sonden.

Der photoinduzierte Elektronentransfer kann in einem Donor-Akzeptor-System wie folgt beschrieben werden:



Um die Triebkraft dieses Elektronentransfers zu ermitteln, bedarf es einer rechnerischen Abschätzung der freien Standardenthalpie nach *Rehm-Weller* (s. Gleichung 2-1).^[32, 33]

$$\Delta G = e [E_{\text{Ox}}(\mathbf{D}) - E_{\text{Red}}(\mathbf{A})] - E_{00} + C \quad (\text{Gleichung 2-1})$$

ΔG	freie Enthalpie
e	Elementarladung
$E_{\text{Ox}}(\mathbf{D})$	Oxidationspotential des Ladungsdonors
$E_{\text{Red}}(\mathbf{A})$	Reduktionspotential des Ladungsakzeptors
E_{00}	Energie des HOMO-LUMO-Übergangs des Donors
C	Coulomb-Energie, hier ~ 0

Der Term $e[E_{\text{Ox}}(\mathbf{D}) - E_{\text{Red}}(\mathbf{A})] - E_{00}$ setzt sich aus den Redoxpotentialen der Neutralverbindungen und dem Betrag der Anregungsenergie zusammen. Die Redoxpotentiale der Verbindungen sind durch elektrochemischen Methoden bestimmbar. Die Singulett-Singulett-Energie E_{00} ist aus dem Schnittpunkt zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektren zu berechnen. Die Coulomb-Energie ist im Regelfall sehr klein und kann in guter Näherung vernachlässigt werden. Die Redoxpotentiale der angeregten Verbindungen werden wie folgt berechnet:

$$\Delta G = E^0(\mathbf{D}^*) - E^0(\mathbf{A}) - E_{00} \quad \text{reduktiver Elektronentransfer (Gleichung 2-2)}$$

$$\Delta G = -E^0(\mathbf{D}^*) + E^0(\mathbf{A}) - E_{00} \quad \text{oxidativer Lochtransfer (Gleichung 2-3)}$$

2.1.1 Oxidativer Lochtransfer

2.1.1.1 Biologische Bedeutung

Die DNA der Organismen kann durch Radikale geschädigt werden. Diese entstehen durch verschiedene Faktoren, wie z. B. durch ionisierende Strahlung, organische Radikale oder auch photochemische Oxidationsmittel.^[11, 29, 30] Sie können die Nukleobasen oxidieren, das unter anderem zum Strangbruch führen kann. Für die Reparatur solcher Schäden sind spezielle

Reparaturenzyme verantwortlich, welche die Unversehrtheit des Genoms kontrollieren und wieder herstellen. Falls diese Schutzmechanismen der Zelle versagen, können Schädigungen der DNA mutagene, karzinogene oder letale Auswirkungen haben.^[31] Aufgrund der beobachteten Schädigung des Erbguts lag das Hauptinteresse der Forschung auf dem oxidativen Lochtransfer.^[11, 32-34]

Bei der oxidativen radikalischen DNA-Schädigung entsteht das $G^{\bullet+}$ -Radikalkation als wichtiges Intermediat.^[35] Es wurde festgestellt, daß die oxidative Spaltung des DNA-Doppel-stranges an guaninreichen Stellen stattfindet. Falls kein G in der Basensequenz vorhanden ist, wird angenommen, daß auch A als intermediärer Ladungsträger fungieren kann.^[36] Das $G^{\bullet+}$ -Radikalkation kann durch Reaktion mit O_2 oder H_2O verschiedene Oxidationsprodukte bilden, wie z. B. 8-Oxoguanosin (8-oxo-dG). Dies liegt nur zum Teil in der anti-Konformation vor und kann sich dann nur zum Teil wie Guanosin mit Cytosin paaren. 8-oxo-dG liegt aber zum Teil auch in der syn-Form vor. Daher kommt es zur Bildung eines sog. Hoogsteen-Basenpaares mit Adenosin.^[37] Bei der Zellteilung wird dieser DNA-Strang repliziert und das ursprüngliche GC-Paar durch ein AT-Paar ersetzt. Folglich kommt es zur Mutation $G-C \rightarrow A-T$ (s. Abbildung 2-3).^[38, 39] Genauere Untersuchungen zu der Entstehung dieses Fehlers der DNA-Polymerase wurden von *Carell et al.* aufgeklärt.^[40]

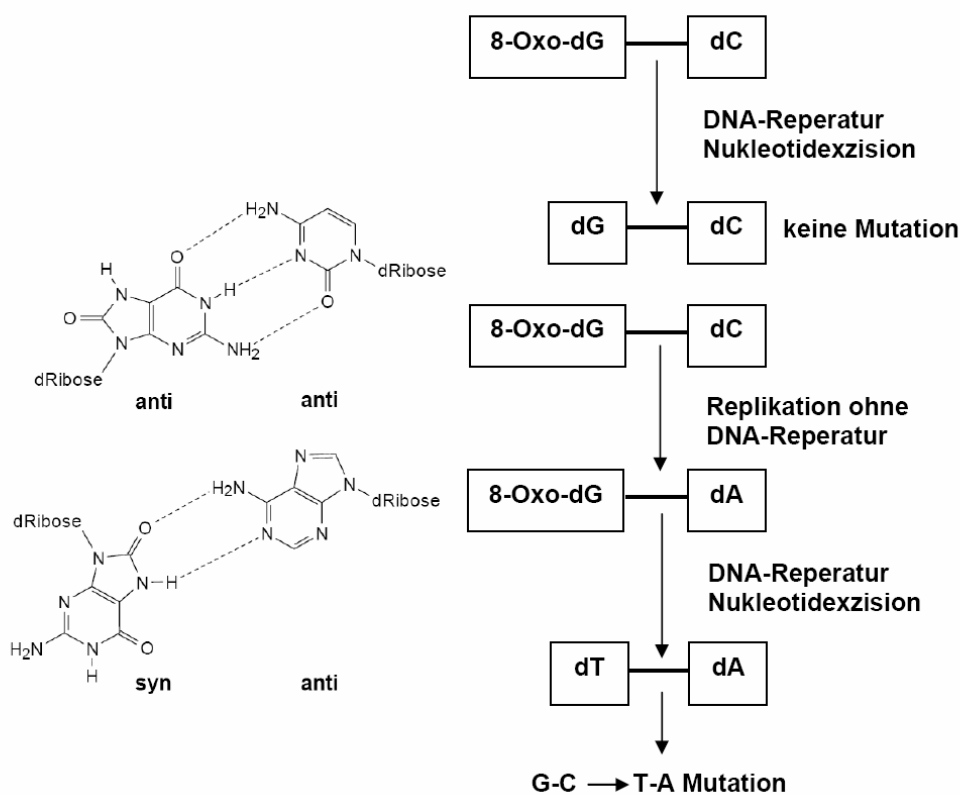


Abbildung 2-3: Beispiel einer G-C → T-A Mutation als Folge oxidativer Schädigung des Guanins.

2.1.1.2 Mechanistische Modelle für den oxidativen Lochtransfer und -transport

Um oxidative Schädigungen der DNA verstehen zu können, ist es notwendig die Mechanismen der Ladungsentstehung und der Ladungstransferprozesse zu kennen. Der oxidative Lochtransfer folgt prinzipiell zwei verschiedenen Mechanismen. Dabei handelt es sich um den stark distanzabhängigen Superaustausch- und den mehrstufigen Hopping-Mechanismus.

Superaustausch-Mechanismus

Beim Superaustausch-Mechanismus (s. Abbildung 2-4) tunnelt die Ladung in einem Schritt vom Donor zum Akzeptor, ohne sich selbst auf der DNA-Brücke aufzuhalten.^[41] Die Ladungstransferrate k_{CT} ist zum einen vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor und zum anderen vom Parameter β abhängig. Diesen Zusammenhang beschreibt die *Marcus-Theorie*^[42] mit:

$$k_{CT} = \frac{4\pi^2 |V_{el}|^2}{h} \sqrt{\frac{1}{4\pi\lambda k_B T}} \exp \left(-\frac{\{\Delta G_{CT} + \lambda\}^2}{4\lambda k_B T} \right) \quad (\text{Gleichung 2-4})$$

k_{CT}	Ratenkonstante des Ladungstransfers
V^2	Matrixelement der elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor
λ	Reorganisationsenergie
k_B	Boltzmannkonstante
T	absolute Temperatur
ΔG_{CT}	Triebkraft des Ladungstransfers

Nach starker Vereinfachung ergibt sich:

$$k_{CT} \propto e^{-\beta R} \quad (\text{Gleichung 2-5})$$

β	Maß für die Distanzabhängigkeit
R	Donor-Akzeptor-Distanz

Der Parameter β ist abhängig von den Eigenschaften der Brücke, die die Kopplung zwischen Donor und Akzeptor beeinflusst. Er ist eine charakteristische Größe des zu untersuchenden Systems. Aus den zeitaufgelösten Experimenten erhielt man im Wesentlichen folgende Erkenntnisse über den Lochtransfer in DNA:

- Der Lochtransfer ist auf kleine Distanzen, d.h. drei bis vier Basenpaare, beschränkt.
- Der Ladungstransfer verläuft über kürzere Entfernungen sehr schnell ($k_{CT} = 10^9$ bis 10^{12} s^{-1}).

- Die für die Distanzabhängigkeit charakteristischen β -Werte liegen typischerweise zwischen $0.6\text{-}0.8 \text{ \AA}^{-1}$.
- Die Interkalation von Donor und Akzeptor ist entscheidend für einen schnellen und effizienten Ladungstransfer.

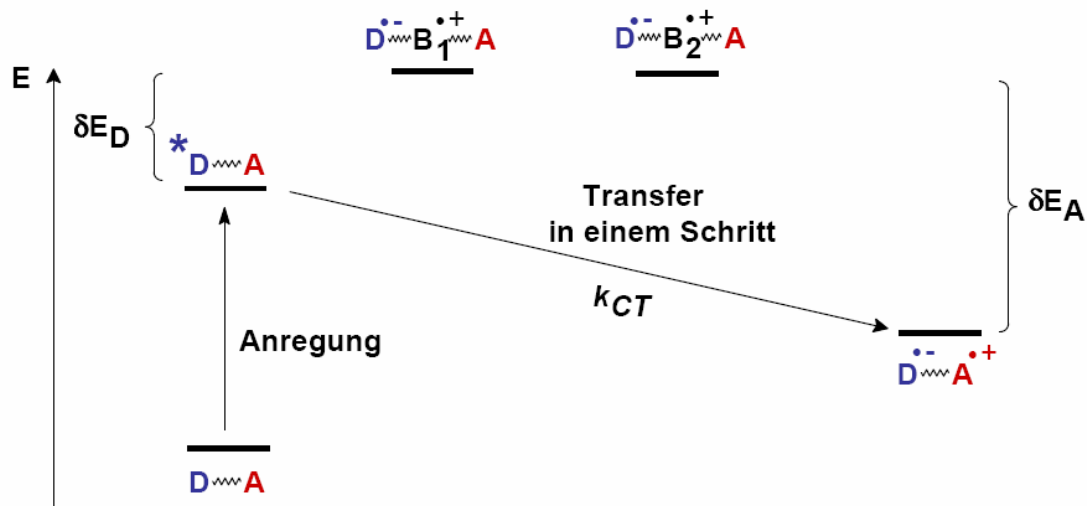


Abbildung 2-4: Superaustausch-Mechanismus des photoinduzierten Lochtransfers in DNA; **D** = Donor, **A** = Akzeptor, **B** = Base.

In einigen Experimenten zur Reichweite des Ladungstransfers ($>200 \text{ \AA}$) konnte eine deutlich geringere Distanzabhängigkeit beobachtet und somit der alternative Mechanismus, der sog. Hopping-Mechanismus vorgeschlagen werden.

Hopping-Mechanismus^[43]

Beim Hopping-Mechanismus (s. Abbildung 2-5 und 2-6) wird die Ladung in mehreren Schritten vom Donor über die DNA-Brücke zum Akzeptor transportiert.^[41, 42, 44] Die leicht zu oxidierenden Guanine dienen dabei als intermediäre Ladungsträger. Oxidierte Guaninprodukte sind die Folge des Auftretens von Guanin-Radikalkationen und können, wie oben beschrieben, gelelektrophoretisch nachgewiesen werden. Beim Hopping-Mechanismus ist die Geschwindigkeit des Ladungstransports nicht von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor abhängig, sondern von der Anzahl N der Hopping-Schritte und der Lage der Potentiale relativ zur DNA-Brücke. Somit ist β kein geeigneter Parameter mehr und die Marcus-Levich-Jortner-Gleichung für den Hopping-Mechanismus nicht anwendbar. Stattdessen wird die Geschwindigkeit des Lochtransportes mit folgender Beziehung beschrieben:

$$k_{\text{HOP}} \propto N^{-\eta} \quad \eta: \text{Konstante (Gleichung 2-6)}$$

k_{HOP}	Ratenkonstante des Ladungstransfers
N	Anzahl der Hopping-Schritte
η	Mediumspezifische Konstante

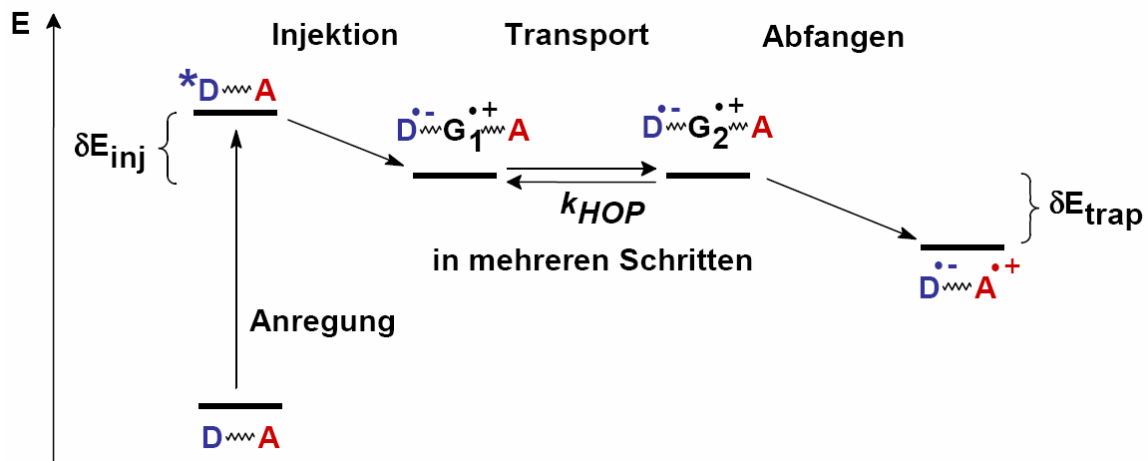


Abbildung 2-5: Hopping-Mechanismus des photoinduzierten Lochtransports in DNA, **D** = Donor, **A** = Akzeptor **G** = Guanin, k_{HOP} = Geschwindigkeit eines Hoppingschrittes

Lewis und Wasielewski *et al.* konnten die Ladungstransportgeschwindigkeit eines einzelnen Hopping-Schrittes von $k_{\text{HOP}} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ messen.^[45a]

In A:T-basenreichen Sequenzen fungiert A als intermediärer Ladungsträger (s. Abbildung 2-6) während des A-Hoppings. Giese *et al.* berichteten, dass der Mechanismus des Ladungstransportes zwischen zwei Guaninen von der Anzahl der dazwischen liegenden A:T-Basenpaare abhängt.^[44, 46, 47] Bei kurzen A:T-Brücken (bis drei A:T-Basenpaare) verläuft der Ladungstransport eines einzelnen Hopping-Schrittes nach dem Superaustausch-Mechanismus. Bei langen Brücken (ab sieben A:T-Basenpaare) verläuft der Ladungstransport nach dem A-Hopping-Mechanismus. Der Ladungstransport über Adeninbasen ist so schnell, dass die Länge der A:T-Basenpaare nicht erheblich ist. Beim A-Hopping werden die Adeninbasen wahrscheinlich chemisch nicht zu Oxidationsprodukten abgefangen.

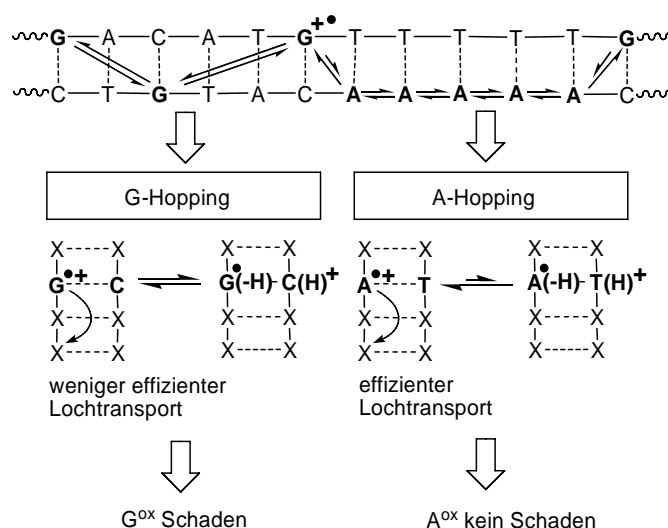


Abbildung 2-6: Vergleich des Hopping-Mechanismus über Guanine und Adenine.

Diese These von *Giese et al.* konnte in neueren Arbeiten von *Lewis et al.*^[48] bestätigt werden. Durch zeitaufgelöste spektroskopische Experimente mit Stilbendicarboxamid (Sa) als photoanregbarer Donor und Stilbendiether (Sd) als Lochakzeptor konnten die Ratenkonstanten des oxidativen Ladungstransfers in Abhängigkeit der Anzahl dazwischenliegender A-T-Basenpaaren bestimmt werden (s. Abbildung 2-7).

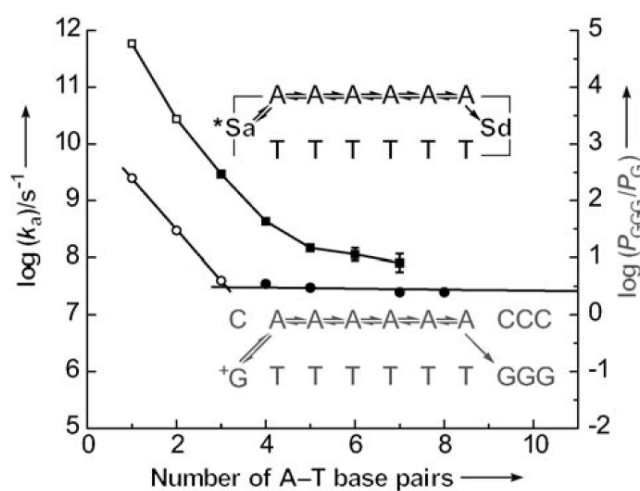


Abbildung 2-7: Oben: Bestimmung der Ratenkonstanten des oxidativen Ladungstransfers nach *Lewis et al.*;

Sa = Stilbendicarboxamid als photoanregbarer Donor und Sd = Stilbendiether als Lochakzeptor.^[48] Unten: Strangbruchresultate von *Giese et al.*^[44, 46, 47]

Es konnte herausgefunden werden, dass die Ladungstransportraten bei kurzen A-T-Basenpaaren (bis drei Basenpaare) distanzabhängig und sehr schnell ist (für $n = 1$: $k_{CT} \sim 580 \cdot 10^{-9} s^{-1}$, für $n = 3$: $k_{CT} \sim 3 \cdot 10^{-9} s^{-1}$). Für $n = 4$ bis $n = 7$ ändert sich der Ladungstransport nur geringfügig mit dem Abstand

zwischen Donor und Akzeptor ($n = 4$: $\Delta k_{CT} \sim 0.4 \text{ s}^{-1}$; $n = 7$: $\Delta k_{CT} \sim 0.08 \text{ s}^{-1}$). Weiterhin konnte bestätigt werden, dass man für eine Distanz von 3-4 A-T-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor von einem distanzabhängigen Tunnelprozess nach dem Superaustausch-Mechanismus ausgehen kann. Bei einem größeren Abstand ist der Ladungstransfer kaum mehr distanzabhängig und folgt einem Hopping-Mechanismus.

Der Hopping-Mechanismus wird in diversen Varianten diskutiert,^[44, 49-51] wie von *Schuster et al.* über den sog. phononenunterstützte Polaron-Hopping-Mechanismus. Dieses Modell ist von leitenden Polymeren abgeleitet und berücksichtigt, dass Ladungen in DNA eine lokale Änderung der Struktur, sog. Polarone, induzieren. Im Falle des Lochtransfers werden Radikalkationen der einzelnen Nukleobasen durch eine räumliche Annäherung der benachbarten Nukleobasen stabilisiert.^[52-54] Dieser Mechanismus ist kein neuer, sondern eine diskutierte Modifizierung des Loch-Hopping-Mechanismus.

In neueren Experimenten wird neben den beiden mechanistischen Modellen auch die Moleküldynamik der DNA mit einbezogen.^[55] Man nimmt an, dass die Voraussetzung für einen effizienten Ladungstransport eine optimale Überlappung der zwischen Donor und Akzeptor liegenden Orbitalen ist. Man bezeichnet dieses Konzept als *Base Gating* und nimmt an, dass es sowohl für den oxidativen wie auch den reduktiven Ladungstransport von Bedeutung ist.

2.1.1.3 Bisherige Studien zum oxidativen Lochtransfer und -transport

Biochemische Studien

Bei der oxidativen radikalischen DNA-Schädigung entsteht das $G^{\bullet+}$ -Radikalkation als wichtiges Intermediat.^[35] Dieses kann durch Reaktion mit O_2 oder H_2O zur Bildung verschiedener Oxidationsprodukte (dG^{ox}) führen. Neben 8-Oxoguanosin (8-oxo-dG) konnten noch weitere Folgeprodukte identifiziert werden (s. Abbildung 2-8). Der Nachweis von derartigen Schäden lässt sich z. B. durch die Strangbruchexperimente nachweisen. Die oxidierten DNA-Stränge werden durch die Behandlung mit einer Base (z. B. Piperidin) bei erhöhter Temperatur (90 °C) gespalten.

Diese Fragmente kann man nun gelelektrophoretisch oder mittels HPLC nachweisen und quantifizieren.

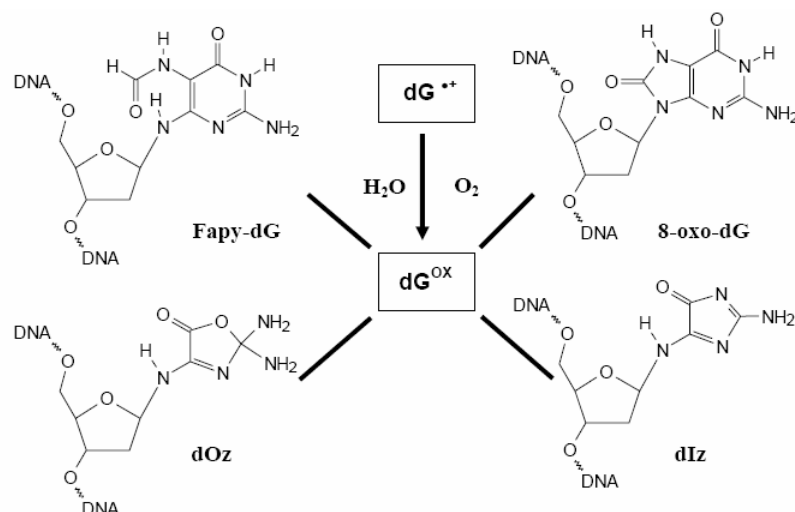


Abbildung 2-8: Übersicht der identifizierten Oxidationsprodukte des Guanins (dG^{ox}); Formamidopyrimidin (**Fapy-dG**), 8-Oxo-Guanin (**8-oxo-dG**), Oxazolon (**dOz**), Imidazolon (**dIz**).

Die gebräuchlichsten Photooxidantien für DNA sind Metallkomplexe von Rh(III)^[56-67] und Ru(II)^[57, 65-72] mit Interkalatoren als Liganden oder organische Chromophore wie z. B. Derivate des Ethidiums^[36, 73], Anthrachinons^[74-84] und cyanobenzochinonmodifizierte Uridine^[85-97] (s. Abbildung 2-9). Diese Redoxsysteme unterscheiden sich grundlegend in ihren strukturellen Eigenschaften, Redoxpotentialen und Absorptionsspektren. In einigen Experimenten konnte ein effizienter Lochtransport z. T. über sehr lange Distanzen ($> 200 \text{ \AA}$)^[58, 98] beobachtet werden. Das System von Giese *et al.*^[44, 50, 99-104] nimmt eine Sonderstellung ein, da hier durch eine photochemische Reaktion, der Norrish-Typ-I-Reaktion, zunächst ein Radikalkation aus einem 4'-acylierten Thymidinderivat^[105] erzeugt wird. Diese radikalische Spezies besitzt bereits im Grundzustand ein höheres Oxidationspotential als G und führt zur Oxidation des nächstgelegenen Guanins.

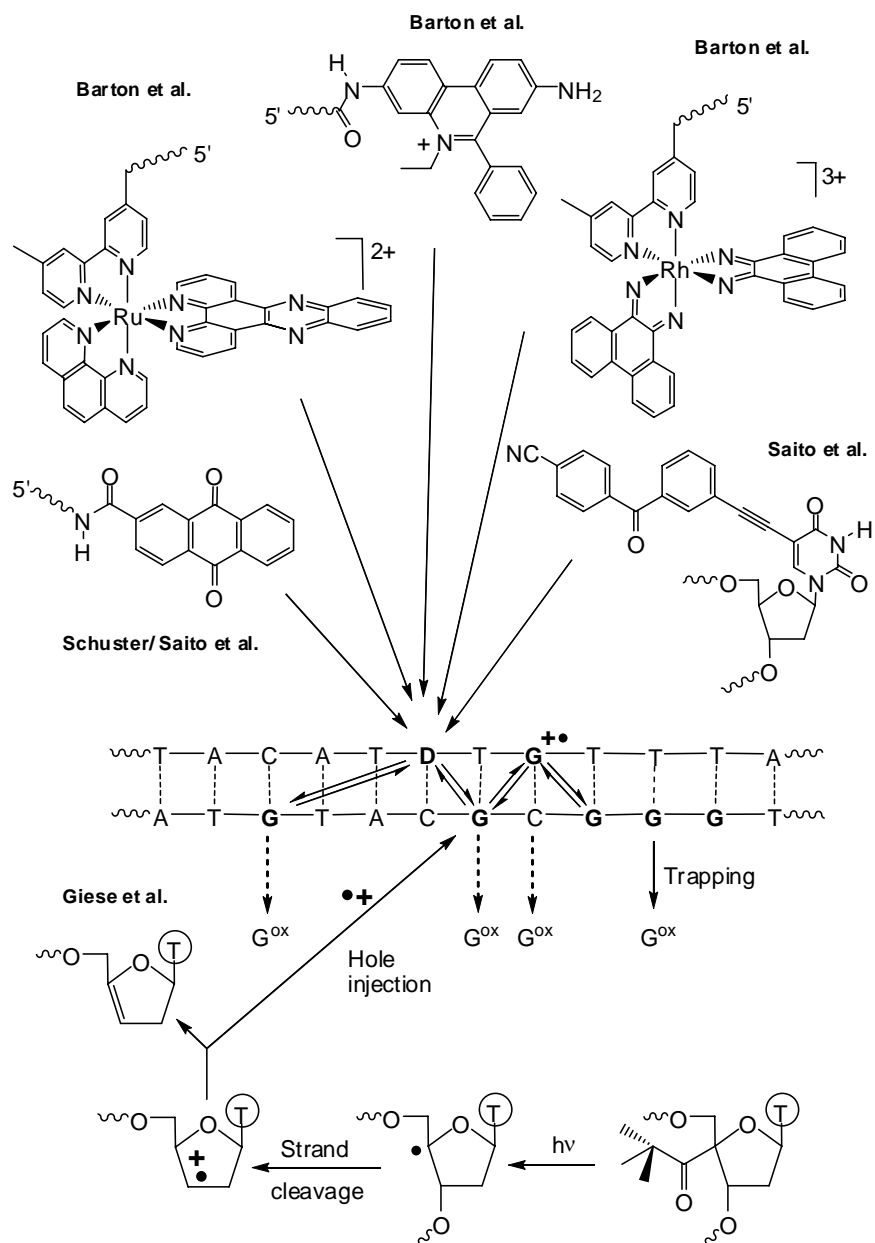


Abbildung 2-9: Übersicht über verwendeten Ladungsdonorsysteme in Studien zum oxidativen Lochtransportes.

Spektroskopische Studien zum oxidativen Lochtransfer

Bei der Untersuchung des oxidativen Lochtransfers wurden verschiedene Systeme verwendet. Diese unterscheiden sich in ihren Redoxpotentialen, strukturellen Eigenschaften und Absorptionsverhalten. Ein Überblick der wichtigsten Systeme mit entsprechenden Ergebnissen bietet die Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1: Übersicht der wichtigsten spektroskopischen Untersuchungen des oxidativen Ladungstransfers.

Ladungsdonor	Akzeptor	$\beta/\text{\AA}^{-1}$	$k_{\text{CT}}/\text{s}^{-1}$	Forschungsgruppe	Jahr
5'-Ru ²⁺	5'-Ru ³⁺	0.2	10 ⁹	Barton ^[106]	1993
Nuk-Ru ²⁺	Nuk-Ru ³⁺	1.0-1.5	10 ⁶	Meade ^[107]	1995
SbA	G/Z	0.64	10 ⁸ -10 ¹²	Lewis/ Wasielewski ^[45, 48, 108-121]	1997
5'-Et	5'-Ru ³⁺	-	10 ¹⁰	Barton ^[43, 106, 122-125]	1997
Acr	G	1.4	10 ⁵ -10 ¹⁰	Tanaka ^[126, 127]	1998
5'-Et	Z	-	10 ¹²	Barton/ Zerwail ^[36, 55, 122-125, 128]	1999
2-Ap	G	0.1-1.0	10 ⁹ -10 ¹¹	Barton/ Zerwail ^[122-125, 128-131]	1999
2-Ap	G	0.75	10 ⁶ -10 ⁷	Shafirovich/ Geacintov ^[132-138]	2000
Acr	G/Z	2.0/0.8	10 ⁷ -10 ¹²	Michel-Beyerle ^[139-142]	2001
Py/Pz ⁺	G	0.2-0.3	10 ⁴	Majima/ Kawai ^[143-148]	2001
5'-Ru ²⁺	In	-	$\geq 10^9$	Barton ^[106, 122-125, 149-151]	2002
SbA	Sb	0.4	10 ⁸	Lewis/Wasielewski ^[45, 111, 152]	2004
Nuk-Et	Z	0.4	10 ¹⁰ -10 ¹¹	Fiebig/ Wagenknecht ^[153]	2005

Erläuterungen: **5'-Ru²⁺** und **5'-Ru³⁺**: Rhodiumkomplexe; **Nuk-Ru²⁺** und **5'-Ru³⁺**: Rutheniumkomplexe, an Nukleosid gebunden; **Acr**: Acridin; **Ap**: 2-Aminopurin; **Eth**: Ethidium; **G**: Guanin; **In**: 4-Methylindol; **Py**: Pyren; **Pz**: Phenothiazin; **SbA**: Stilbendicarboxamid; **Sd**: Stilbendiether; **Nuk-Et**: Ethidium, an Nukleosidanalogen gebunden, **Z**: 7-Deazaguanin.

2.1.2 Reduktiver Elektronentransfer und -transport

Der reduktive Elektronentransfer bzw. -transport tritt auf, wenn ein Elektron aus dem angeregten Donor in die DNA injiziert bzw. auf einen Akzeptor übertragen wird (s. Abbildung 2-1). Analog zum Lochtransport wurde beim reduktiven Elektronentransport der Trend der Reduzierbarkeit der DNA-Basen für Mechanismusvorschläge zu Grunde gelegt. Demnach nimmt die Reduzierbarkeit der einzelnen Basen in folgender Reihenfolge ab: T,U \approx C > A > G.^[154-156] Die am leichtesten reduzierbaren DNA-Basen sind Thymin und Cytosin.

Im Gegensatz zum oxidativen Lochtransport sind beim reduktiven Elektronentransport keine Folgereaktionen bekannt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Ladungstransfer bei Basenfehlpaarungen und Basenschäden gehindert oder ganz unterbunden wird. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird der reduktive Elektronentransport in der DNA-Chiptechnologie, bei der elektrochemischer Analyse fraglicher DNA-Sequenzen, bereits angewandt.^[157-165]

2.1.2.1 Biologische Relevanz des reduktiven Elektronentransfers und -transportes

In Gegenwart von UV-Licht wird die DNA geschädigt. Dabei entstehen nicht nur photochemische Oxidationsprodukte (dG^{ox}),^[35, 36, 166, 167] sondern vor allem Photoprodukte wie die Pyrimidindimere,^[166, 167] die vornehmlich unter den Namen Thymindimere (T^+T) oder *syn*-Cyclobutan-Pyrimidin Dimere (CPD) bekannt sind.^[168] Weitere Photoprodukte sind die 6-4-Photoprodukte (6-4 PP).^[175-176] Diese können entweder aus zwei Thyminen oder aus Thymin und Cytosin (s. Abbildung 2-10) entstehen.

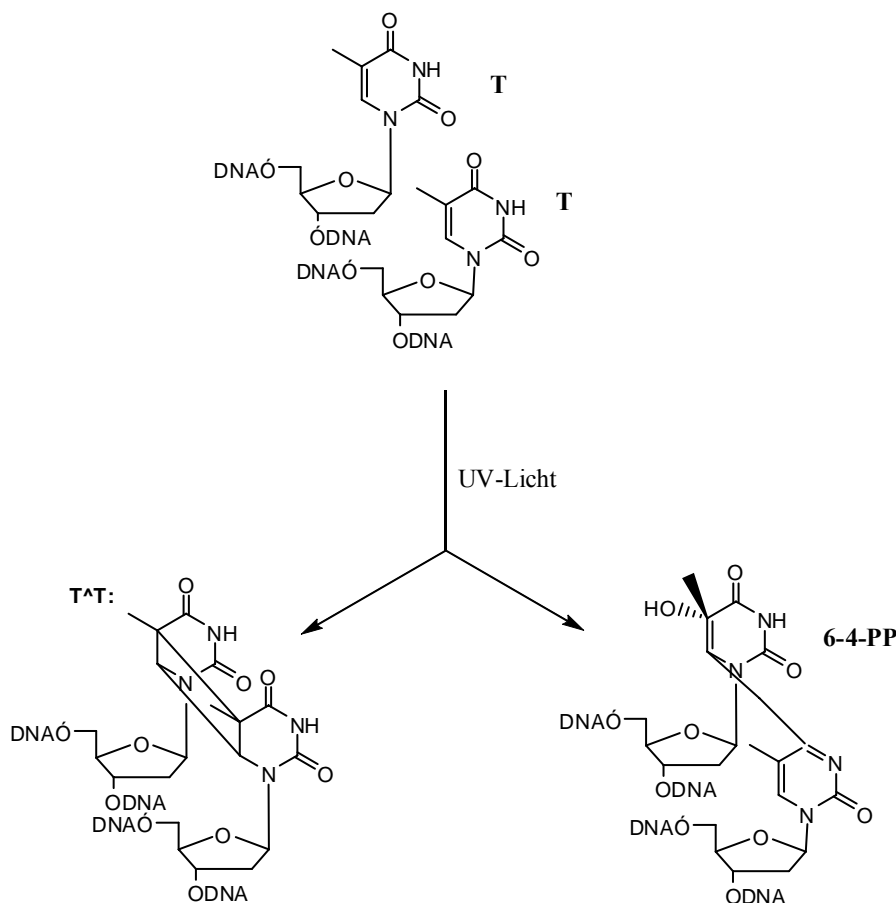


Abbildung 2-10: Entstehung der Pyrimidindimeren nach einer [2+2] Cycloaddition; *cis-syn* Thymidin-Thymidin Dimers (T^+T) bzw. *syn*-Cyclobutan-Pyrimidin Dimere (CPD) und 6-4-Photoprodukt (6-4 PP) aus zwei Thyminen.

Das Entstehungsverhältnis zwischen $T^{\wedge}T$ und 6-4 PP beträgt ca. 10:1.^[169] Bei der Entstehung von Thymindimeren ($T^{\wedge}T$) gehen zwei benachbarte Thymine eine kovalente Vernetzung ein und bilden einen Cyclobutanring. Bei 6-4 PP ist das Pyrimidin-Pyrimidon 6-4-Photoprodukt. Anders als bei Cyclobutandimeren ist das primäre Photoprodukt eine [2+2] Cycloaddition zwischen der C5-C6 Doppelbindung und der Carbonyl-Gruppe von C-4. Dabei entsteht im Fall von zwei Thymine ein Oxetan als Primärprodukt und im Fall von Thymidin-Cytidin entsteht ein Azetin. Letztlich entsteht das stabile (6-4)-Photoprodukt bzw. sein Dewar-Isomer. Beim Verbleib dieser Dimere in der DNA von Prokaryonten kann bereits tödlich sein.^[170] Denn es können z. B. nicht nur benachbarte Thymine desselben DNA-Strangs, sondern auch gegenüberliegende Thymine beider DNA-Stränge vernetzt sein. Diese Photoprodukte können dann ein sehr effektives Replikationshindernis darstellen. Diese DNA-Schäden werden mit DNA-Photolyasen (CPD-Photolyasen und 6-4-Photolyasen) behoben. Photolyasen sind spezielle Enzyme, die die Schäden erkennen und durch den reduktiven Elektronentransfer beheben können. Bei diesem Reparaturmechanismus bindet sich die CPD-Photolyase zuerst an die DNA und erkennt das Dimer.^[171-173] Nach der Photoreaktivierung wird ein Elektron von der chromophoren Gruppe $FADH^{\cdot-}$ auf den Cyclobutanring übertragen und monomerisiert. Nach einem ähnlichem Prinzip funktioniert die Spaltung der 6-4-Photoprodukte (s. Abbildung 2-11). Diese verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt bildet sich die Oxetan- bzw. die Azetin-Zwischenstufe über eine Protonierungs/ Deprotonierung Stufe zurück.^[174-176] Im zweiten Schritt wird, wie bei der CPD Spaltung, ein Elektron des $FADH^{\cdot-}$ auf das Oxetan/ Azetin übertragen und so das Dimer gespalten.

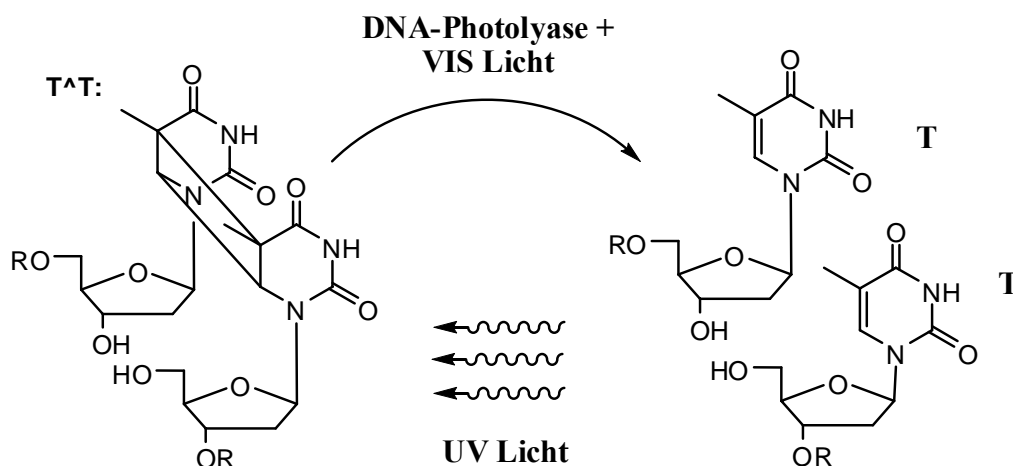


Abbildung 2-11: Beispiel für die Spaltung eines cis-syn Thymidin-Thymidin Dimers ($T^{\wedge}T$) mit der CPD-Photolyase.

Neben den Photolyasen gibt es weitere Beispiele für DNA-Reparaturenzyme. Endonuklease III (*Endo III*) und *MutY* gehören zu Basenexzisionsenzymen, die die fehlerhafte Basen aus der DNA-

Sequenz ausschneiden. Beide Enzyme enthalten redoxaktive Cofaktoren, $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, die sich in der Nähe der vermuteten DNA-Enzym-Bindungsstelle befinden.^[177-179] Diese Eisen-Schwefel-Cluster dienen als Elektronenquelle und sind in biologischen Redoxprozessen^[180] weit verbreitet. Das vermutete Prinzip dieser Enzyme ist, durch Elektronentransfer, das ständige Abfragen nach beschädigtem Duplex. Beim intakten Duplex dockt der redoxaktive Cofaktor $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster an die DNA, injiziert ein Elektron in die DNA und der Cluster wird zum $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ oxidiert. In der Nähe befindet sich ein weiterer $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ -Cluster, der zum $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster reduziert wird. Dieser besitzt eine geringere Affinitätskonstante, fällt somit von der DNA ab und steht für die weitere Kontrolle zur Verfügung. Befindet sich zwischen diesen redoxaktiven Clustern ein DNA-Schaden, so wird der Elektronentransfer gestört und der Cluster bleibt gebunden. Das Reparaturenzym erkennt so den Schaden und leitet die Reparatur ein (s. Abbildung 2-12).

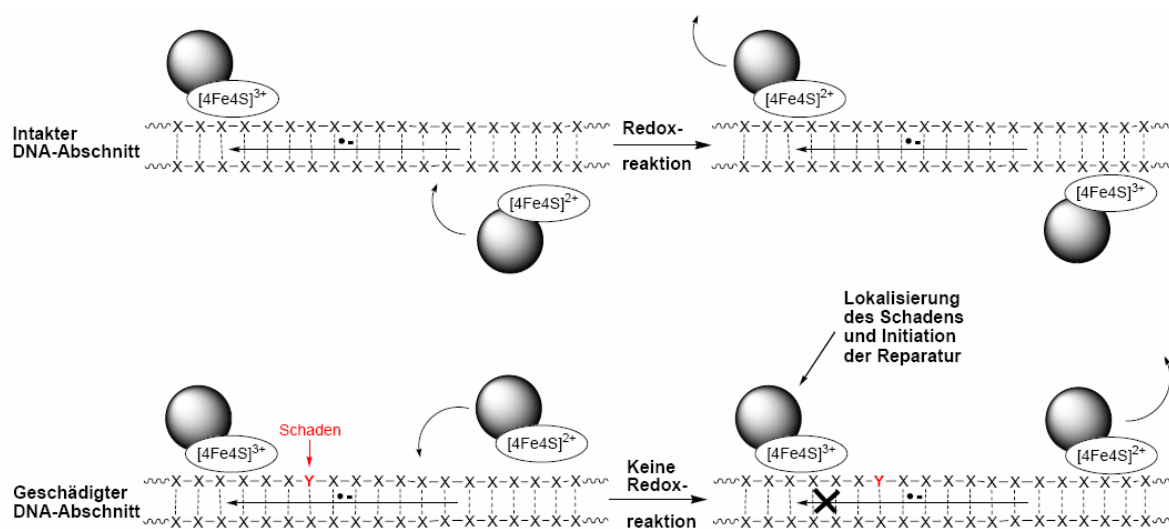


Abbildung 2-12: Postulierter Mechanismus der Überprüfung von DNA auf Intaktheit mittels redoxaktiver Proteine.^[180]

2.1.2.2 Mechanismen

Bei der Interpretierung des reduktiven Elektronentransfers und -transportes wurden die mechanistischen Modelle des oxidativen Lochtransfers übernommen (s. Kapitel 2.1.2.2) und unterdessen experimentell verifiziert wie in den folgenden Abschnitten beschreiben.

2.1.2.3 γ -Puls-Radiolyse-Experimente

Die ersten Untersuchungen zum reduktiven Elektronentransfer und -transportes in DNA stammen aus γ -Radiolysestudien von Sevilla und Anderson *et al.*^[181-183] Diese wurden überwiegend im Eis

oder in glasartigen, wässrigen LiBr-Lösungen bei tiefen Temperaturen durchgeführt. Um einen reduktiven Elektronentransferprozeß auszulösen, müssen die Proben mit γ -Strahlung behandelt werden. Dabei entstehen solvatisierte Elektronen, die in der Lage sind, DNA zu reduzieren. Die native DNA wurde mit verschiedenen Elektronenakzeptoren, die eine hohe Elektronenaffinität aufweisen, wie z. B. Acridin (NC), Mitoxantron (MX) oder Chinolinderivaten^[183] (s. Abbildung 2-13) versetzt, die in zufälligen Abständen interkalieren. Diese auftretenden Radikale in der DNA oder des Akzeptors, konnten durch ESR nachgewiesen werden, wobei weder der Ort des Eintritts des Elektrons in den Basenstapel noch der Ort seines Abfanges bekannt ist.

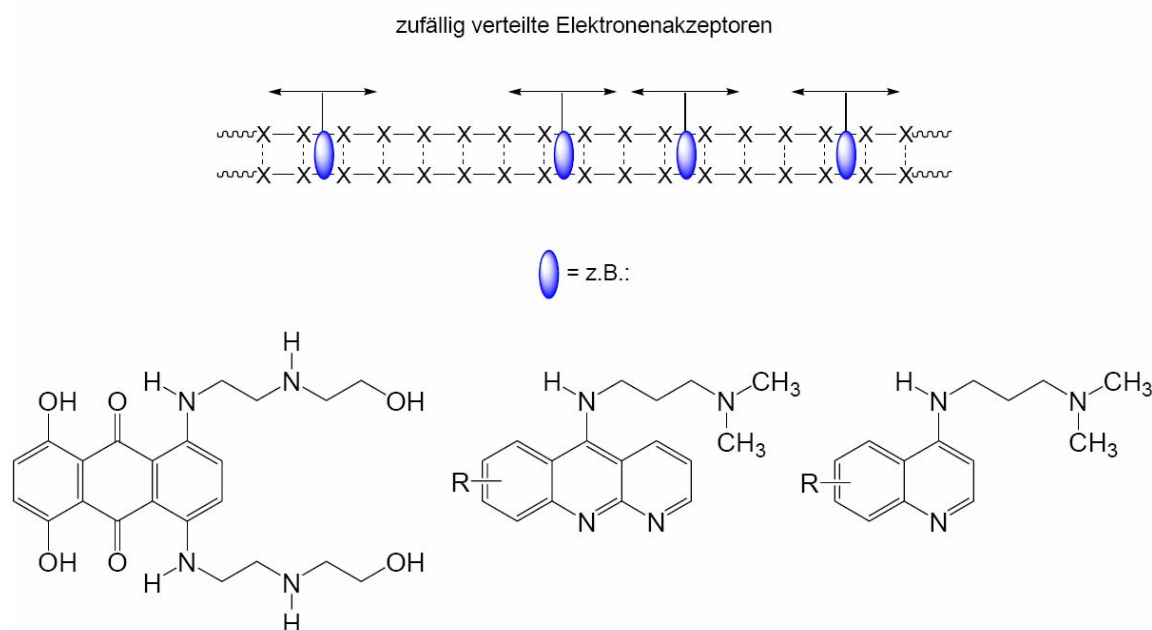


Abbildung 2-13: Interkalierende Elektronenakzeptoren zur Untersuchung des Überschusselektronentransfers durch γ -Puls- Radiolyse in Kombination der ESR-Spektroskopie.

2.1.2.4 Photoinduzierte Elektronentransfer und -transport

Photochemische Studien

Für photochemische Untersuchungen zur Injektion und zum Transport von Überschusselektronen in der DNA wurden in Analogie zu den Untersuchungen zum Lochtransport, photoaktivierbare Elektronendonoren wie Flavin-,^[184] Stilben-,^[185] Pyren-,^[186] Ethidium-^[43] und Phenothiazinderivate^[28] u.s.w. eingesetzt, die kovalent mit den jeweiligen Oligonukleotiden verknüpft wurden. Durch photochemische Anregung, dieser in der DNA interkalierten Verbindungen, wurde in diesen Experimenten ein Elektron freigesetzt, dessen Transport entlang des Duplexes mit chemischen oder spektroskopischen Methoden verfolgt werden konnte. Die Untersuchungen und Ergebnisse werden nun im Einzelnen aufgeführt.

Ausgehend von der Kenntnis des Reparaturmechanismus der DNA-Photolyase (s. Abbildung 2-10,11) entwickelten *Carell et al.* ein DNA-System zur Untersuchung des Elektronentransports von Überschusselektronen. Als Elektronendonator diente ein Flavinderivat, das im reduzierten Zustand ein Redoxpotential von -2.8 V (gg. NHE) (s. Abbildung 2-10) aufweist und demnach in der Lage ist, alle DNA-Basen zu reduzieren.^[187] Zusätzlich wurde ein spezielles T[^]T-Dimer ($E_{\text{red}} = -2.2$ V gg. NHE), als chemischer Detektor, ohne Phosphordiesterbrücke zwischen der 3'- und der 5'-Hydroxygruppe der beiden 2'-Desoxyribofuranosid-Einheiten eingebaut (s. Abbildung 2-14).^[55] Bei Lichtanregung kommt es durch eine Elektronenreduktion zur Cycloreversion des T[^]T-Dimers. Diese bewirkt einen Strangbruch, dessen Produkte mittels HPLC-Analytik quantifizierbar sind. Die Gruppe von *Carell* hat in ihren Experimenten den Abstand zwischen Donor (Flavin) und Akzeptor (T[^]T-Dimer) variiert. Die Reparatureffizienz ist nur schwach abhängig von der Distanz. Dieses Ergebnis unterstützt den Hopping-Mechanismus für den Überschusselektronentransport in DNA. Später wurde noch versucht, die Sequenzabhängigkeit des Hopping-Mechanismus zu untersuchen.^[5188-190] Dabei wurden Stränge als Haarnadel-Systeme mit Flavin als Kopfgruppe hergestellt. Der Vorteil der Haarnadeln ist, dass sie aufgrund ihrer hohen und konzentrationsunabhängigen Schmeltemperatur eine Untersuchung des Elektronentransportes auch über kurze Distanzen in eindeutig definierter Struktur gewährleisten. Donor und Akzeptor wurden im Abstand von zwei bis drei A:T-Basenpaaren platziert und die Reparaturausbeuten bestimmt. Anschließend wurden nacheinander A:T-Basenpaare gegen G:C-Basenpaare ausgetauscht und erneut die Reparaturausbeuten bestimmt. Es wurde festgestellt, daß der Elektronentransport nach dem Hopping-Mechanismus sequenzunabhängig ist.

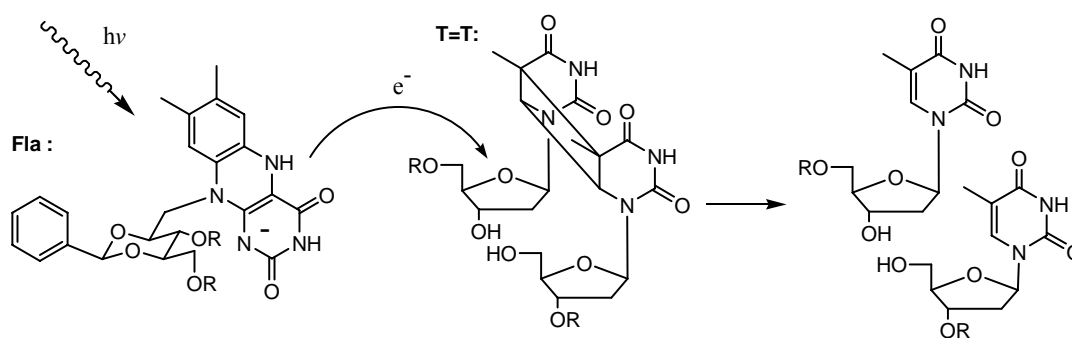


Abbildung 2-14: Indirekter Nachweis des DNA-übertragenen Transportes von Überschusselektronen in der DNA durch Spaltung eines T[^]T -Dimere.

Auch *Rokita et al.* konnten nachweisen,^[191] dass der Elektronentransport offensichtlich nach dem Hopping-Mechanismus verläuft. Allerdings wurde eine Sequenzabhängigkeit festgestellt, die den Ergebnissen von *Carell et al.* widerspricht. Als Donor wurde *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,5-

diaminonaphthalen (TMDN) und als Akzeptor 5-Bromo-2'-desoxyuridin (Br-dU) verwendet (s. Abbildung 2-11). TMDN wurde an einer sog. abasischen Stelle in die DNA eingebaut. Mit diesem System konnte, nach der photochemischen Anregung am Thymin, das dem Br-dU in 5'-Richtung benachbart war, Strangbrüche beobachtet werden. Nach den Ergebnissen von Rokita senken G:C-Basenpaare die Elektronentransporteffizienz deutlich.

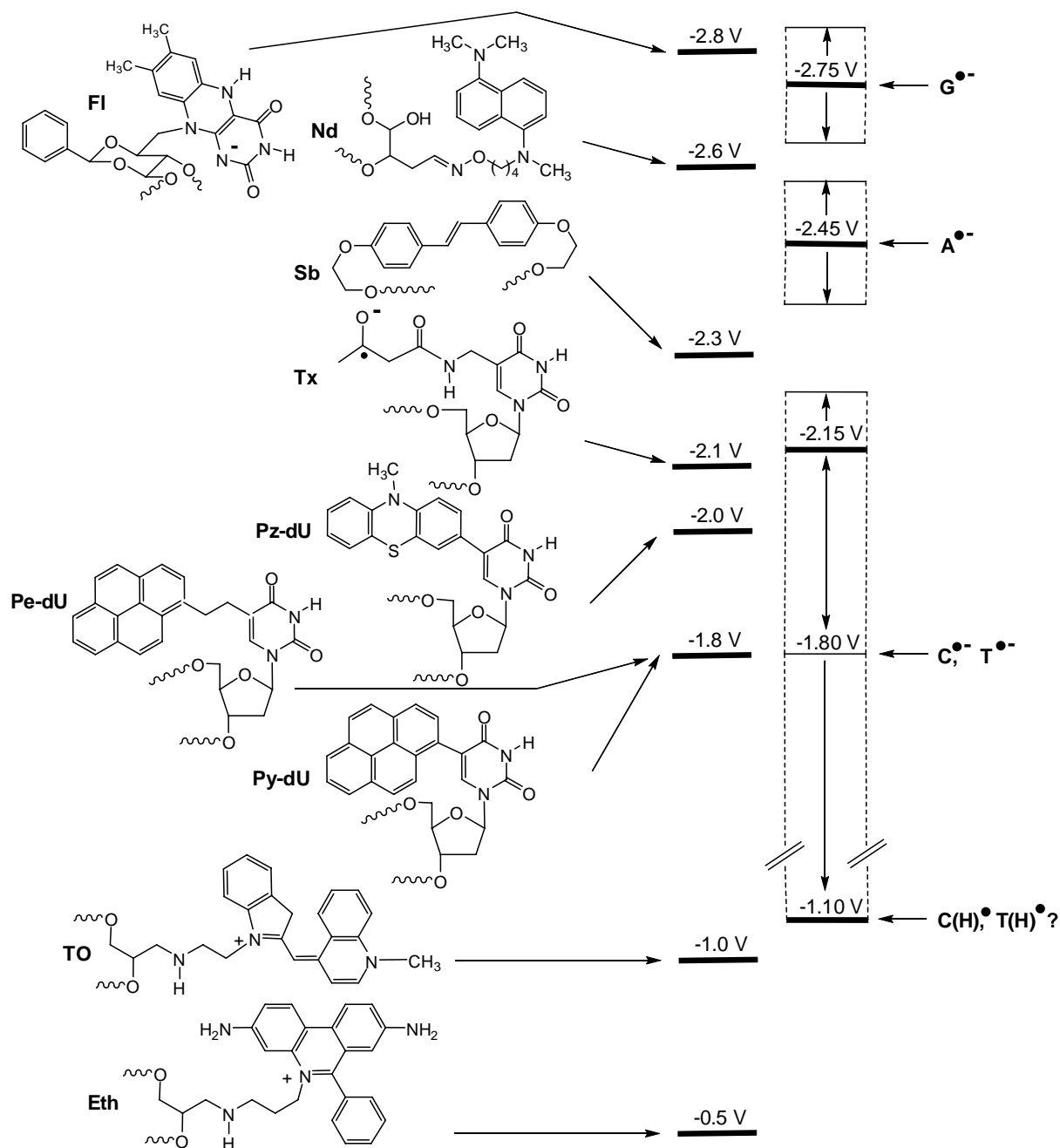


Abbildung 2-15: Reduktionspotentiale der Chromophore, die zur Untersuchung des photoinduzierten Elektronentransportes in DNA und den Hopping-Mechanismen bisher eingesetzt wurden, im Vergleich zu den Reduktionspotentialen der Nukleobasen.

Das System von *Rokita et al.* erscheint genauer als das von *Carell et al.*. Der Grund liegt darin, daß die Spaltung des T⁺T-Dimers (10^6 s^{-1}) im Vergleich zum Elektronentransfer langsamer ist und daher den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Das Detektorsystem von *Rokita et al.* reagiert schneller (10^{10} s^{-1}) und ermöglicht damit Aussagen über die Sequenzabhängigkeit des DNA-Elektronentransportes zu treffen (s. Abbildung 2-16).

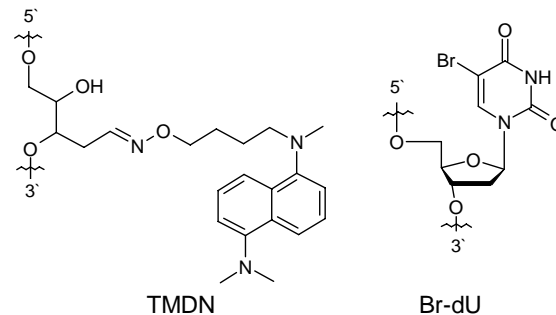


Abbildung 2-16: Von *Rokita et al.* verwendeter Elektronendonator und - akzeptor

Die Gruppen von *Lewis et al.* und *Wasielowski et al.* untersuchten die Energetik und Kinetik der photoinduzierten Elektroneninjektion in DNA-Haarnadeln, die synthetisch mit Stilbendiethern als Kopfgruppe versehen sind.^[185] Die Stilbendiether fungieren als Ladungsdonoren und die Pyrimidin-Nukleobasen als Akzeptoren. Mittels zeitaufgelöster Pikosekunden-Laserspektroskopie wurde die Dynamik der Elektroneninjektion vom photoangeregten Singulett-Zustand des Stilbendiethers auf die entsprechenden Basen untersucht (s. Abbildung 2-17). Dabei wurde folgendes festgestellt:

- Die Elektroneninjektionsgeschwindigkeit mit T als Elektronenakzeptor ist größer als bei C, somit wird die von *Rokita et al.* festgestellte Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers unterstützt.
- T weist ein geringeres Redoxpotential auf als C.
- Die Trennung von Donor und Akzeptor durch die G:G-Brücke verlangsamt die Ladungsinjektionsgeschwindigkeiten. Bereits über drei G:G-Brücken zwischen D und A konnte kein Elektronentransport mehr beobachtet werden. Das heißt, dass der einstufige Elektronentransfer auf kurze Distanzen beschränkt ist.

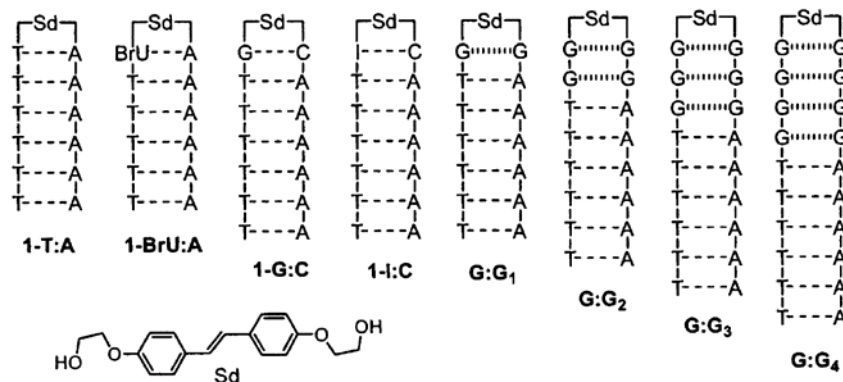


Abbildung 2-17: Von *Lewis et al.* zur Untersuchung der photoinduzierten Elektroneninjektion verwendete DNA-Haarnadeln.

Das von der Gruppe von *Giese et al.* verwendete Ketylradikal des Thyminderivats besitzt ein Redoxpotential von -2.1 V .^[192-193] Die photochemische Spaltung des tert.-Butylketons nach *Norrish* führt zum Ketylradikal, welches das Elektron auf Thymin überträgt. Mit diesem System ist es möglich, selektiv nur ein Elektron in die DNA zu injizieren (s. Abbildung 2-18). Eine weitere Besonderheit dieses Donors ist, daß die Injektion des Elektrons in die DNA aus dem Grundzustand erfolgt.

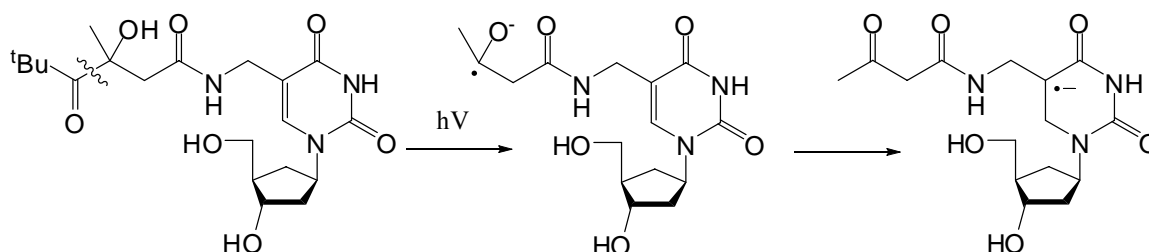


Abbildung 2-18: Das von *Giese et al.* verwendete Thyminderivat. Durch photochemische Spaltung wird nur ein einziges Elektron auf Thymin übertragen.

Netzel et al. hatte 2'-Desoxy-5-(1-pyrenylethyl)-uridin in die Haarnadel-Kopfgruppe inkorporiert. Mit diesem Uridinderivat ist es möglich, aufgrund der Flexibilität des Linkers, gleichzeitig ein Überschusselektron auf das Uracilsystem und eine Ladungsinjektion auf die benachbarten Pyrimidinbasen zu übertragen.^[194]

Auch in unserer Arbeitsgruppe werden für die Untersuchung des Elektronentransportes verschiedene Elektronendonoren verwendet. Mit den phenothiazinmodifizierten Uridinen konnte in Strangbruchexperimenten gezeigt werden, dass der Elektronentransport über A-T-Basenpaare deutlich effizienter verläuft, als über G-C-Paare (s. auch Kapitel 4).^[28] Denn aufgrund der starken

Basizität von $C^{\bullet-}$ ^[65] kommt der Einfluss des Protonentransfers, durch umgebende Wassermoleküle besonders stark bei G-C-Paaren zum Tragen. Somit ist der Elektronentransport in DNA zum Teil an Protonentransferprozesse gekoppelt (s. Abbildung 2-19).

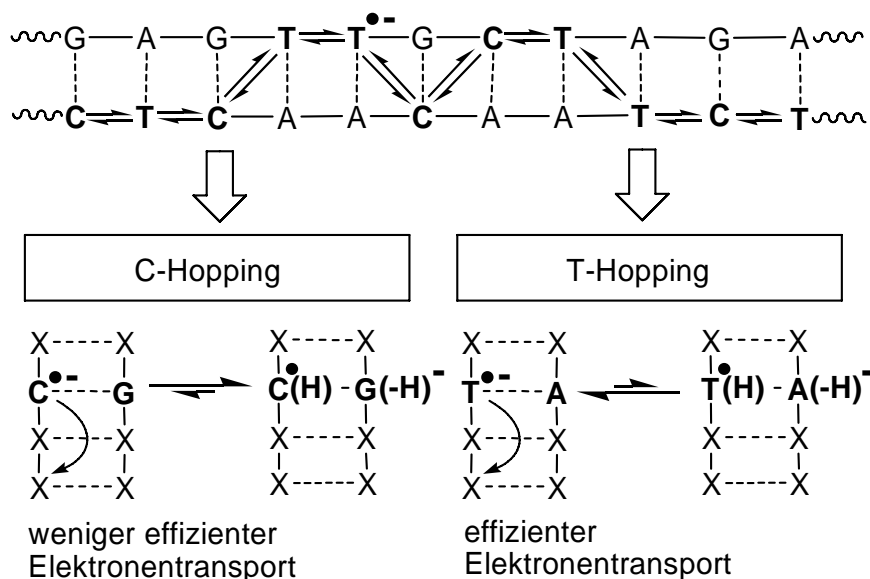


Abbildung 2-19: Darstellung des vorgeschlagenen Mechanismus des reduktiven Elektronentransportes

Mit pyrenmodifizierten Uridinen wurde der Elektronentransfer vom lokal angeregten Zustand des Py (Py^*) auf DNA-Basen untersucht.^[186] Hierbei wurde photochemisch ein ladungstrennter Zustand erzeugt, der aus einem Pyrenylradikalkation ($Py^{\bullet+}$) und dem Radikalanion des Uridins besteht (s. Abbildung 2-20). Die Eigenschaften und die Dynamik des Elektronentransportes konnte durch stationäre Fluoreszenzspektroskopie und transiente Femtosekundenabsorptionsspektroskopie charakterisiert werden. Bei photochemischer Anregung von pyrenmarkierter DNA entsteht zuerst der angeregte Zustand von Pyren (Py^*), aus dem sich der ladungstrennte Zustand in der DNA bildet ($Py^{\bullet+}$ -dU $^{\bullet-}$). Basierend auf dem Redoxpotential (1.5 V gg. NHE) und der Singulett-Energie von Pyren ($E_{00} = 3.25$ eV)^[195] sowie den Reduktionspotentialen der DNA-Basen, wird die Triebkraft dieses Elektronentransfers auf -0.3 eV bestimmt. Kürzlich konnten *Fiebig et al.* mittels zeitaufgelöster Untersuchungen die Reduktionspotentiale der $C^{\bullet-}/C$ - und $T^{\bullet-}/T$ -Paare von -1.8 und -1.9 V bestimmen.^[196] Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Reduktionspotentiale der DNA-Basen stark pH-abhängig sind. Offensichtlich steht der Protonentransfer in Konkurrenz zum Elektronentransfer.

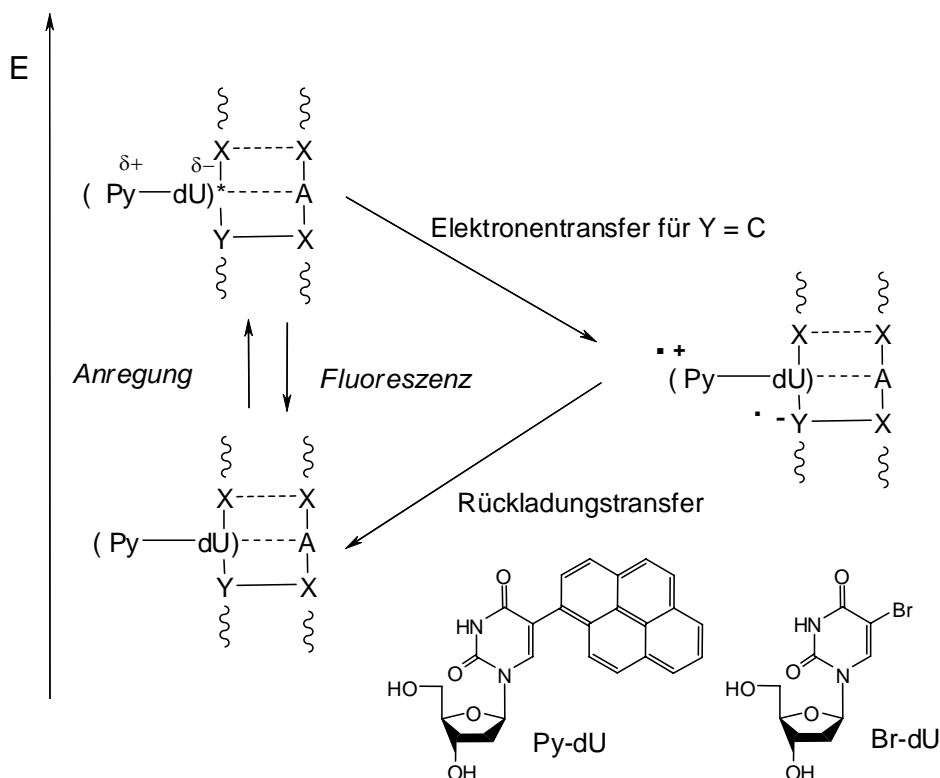


Abbildung 2-20: Pyrenmodifiziertes Nukleosid (Py-dU) als spektroskopisches Modell für den Elektronen-transport in DNA; 5-(Pyrenyl)-2'-desoxyuridin ist dabei der Elektroneninjektor.

Thiazol Orange-Basensurrogat (TO) kann als fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonde verwendet werden, denn nur in doppelmarkierten Einzelsträngen aus TO-Basensurrogat und 5-Nitroinidol konnte ein Elektronentransfer anhand der Fluoreszenzlöschung beobachtet werden. Dabei diente im Donor-Akzeptor-System das TO-Basensurrogat als photoinduzierter Ladungsdonor und 5-Nitroinidol als Ladungsakzeptor. Bei anschließender Hybridisierung wurde der Elektronentransfer gehindert und die Fluoreszenzintensität des TO-Basensurrogats stieg an. Diese Fluoreszenzunterschiede resultieren aus einem stark distanzabhängigen Elektronentransfer, denn bei einer Distanz von zwei Basenpaaren findet dieser zwischen Donor und Akzeptor nicht mehr statt.^[334]

Ein Sonderfall stellt das Ethidium dar, aufgrund seines niedrigen Reduktionspotentials ($E^0(E^{2+}/E^{+•}) = -0.5 \text{ V}$)^[197] ist es im angeregten Zustand in der Lage, eine DNA-Base zu reduzieren und wird ausführlich im Kapitel 2.1.3 vorgestellt.

2.1.3 Ethidium als Loch- und Ladungsdonor

Unter dem Trivialnamen Ethidium versteht man die Verbindung 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenantridininiumbromid (**16**). Ethidium wird vor allem in der Molekularbiologie als Anfärbereagenz für DNA nach einer Gelelektrophorese in der Biochemie und Biologie verwendet (s. Abbildung 2-21).

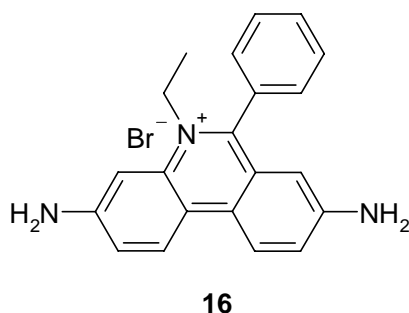


Abbildung 2-21: 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenantridininiumbromid (**16**).

Diese Verbindung eignet sich wegen der Fluoreszenzeigenschaften auch für die Untersuchung des Ladungstransfers in DNA.^[43, 55, 200] Aufgrund der Redoxpotentiale des photoangeregten Chromophors kann **16** in Abhängigkeit der potentiellen Reaktionspartner sowohl als Oxidations- sowie als Reduktionsmittel dienen. Das Oxidationspotential von **16** beträgt $E^0(E^{*+}/E^*) = 1.2 \text{ V}$ ^[36] und hat, eine Singulett-Singulett-Energie von $E_{00} = 2.2 \text{ V}$ ^[36] nach der *Rehm-Weller*-Gleichung, somit ist das photoangeregte Ethidium nicht in der Lage, Guanin ($E^0(G^{*+}/G) = 1.3 \text{ V}$)^[35, 36] zu oxidieren. Das Reduktionspotential des photoangeregten Ethidium beträgt ($E^0(E^{2+}/E^{*+}) = -0.5 \text{ V}$)^[197] und ist somit auch nicht in der Lage, Cytosin und Thymin ($E^0(T/T^{\cdot-}) = E^0(dC/dC^{\cdot-}) = -1.2 \text{ V}$)^[155] zu reduzieren. Deshalb müssen für die Untersuchung des Ladungstransfers mit Ethidium geeignete Ladungsakzeptoren, als Ersatz natürlicher DNA-Basen bereitgestellt werden.

So wurde in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* für die Untersuchungen zum Lochtransfer die leicht oxidierbare, artifizielle Base 7-Deazaguanin (**Z**) als Ladungsakzeptor eingesetzt (s. Abbildung 2-22).^[25] Dieser Ladungsakzeptor hat ein Oxidationspotential ($E^0(Z^{*+}/Z) = 1.0 \text{ V}$)^[55], somit ergibt für diesen Lochtransfer eine Triebkraft ΔG von ca. -0.2 eV . Es ist bekannt, dass **Z** die Fluoreszenz von photoangeregtem Ethidium^[318] aufgrund eines Ladungstransferprozesses löscht.^[155, 197-201] In den Ladungstransferversuchen konnte im System Ethidium-Deazaguanin über eine Distanz von zwei Basenpaaren jede Basenfehlpaarung bzw. die abasische Stelle als repräsentativer DNA-Schaden zuverlässig mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden. Allerdings sinkt der Ladungstransfer in diesem System ab zwei Basenpaaren so stark, dass die Prüfung eines ganzen

Codons unmöglich macht. Der Grund liegt im rigiden Ethidium-Nukleosidanalogen, das die für einen effizienten Ladungstransfer notwendige Umorientierung des photoangeregten Ethidiums kaum bzw. nicht ermöglicht. *Base Gating* ist erschwert. Gleichzeitig dieses Ergebnis unterstreicht den bedeutenden Einfluss der DNA-Dynamik auf die Distanzabhängigkeit und Geschwindigkeit des Ladungstransfers in DNA.

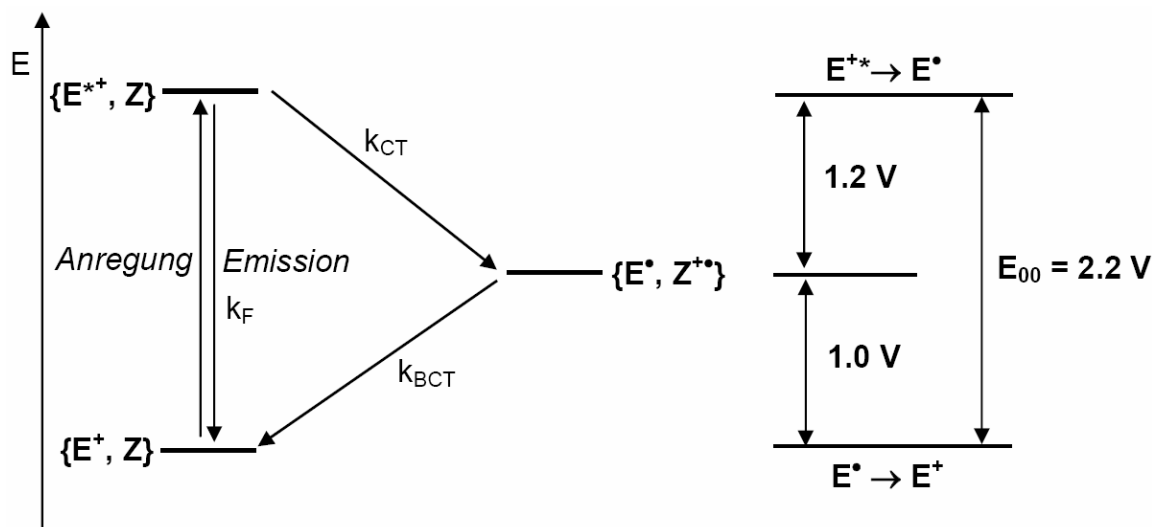


Abbildung 2-22: Photoangeregtes Ethidium als Oxidationsmittel im System Ethidium- Deazaguanin (**Eth/Z**). Erläuterungen: k_{CT} : Rate des Ladungstransfers; k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

In früheren Arbeiten wurde Ethidium meist als Interkalator^[200] eingesetzt oder über verschiedene Linkersysteme^[43, 55, 200] mit der DNA kovalent verknüpft. Im System Ethidium-Deazaguanin von Barton/ Zewail *et al.*^[55] wurde ein Alkyl linker verwendet, mit dem man die Interkalation des Ethidiums bis auf ein Basenpaar genau bestimmt werden kann. Durch die flexible Alkylkette des Linkers konnte die konformationelle Beweglichkeit des Ethidiums im Basenstapel erhalten werden (s. Abbildung 2-23). Dies ermöglichte einen distanzunabhängigen Ladungstransfer zwischen dem Ethidium und dem Deazaguanin zu machen. Aus zeitaufgelösten Experimenten von Barton/ Zewail *et al.*^[55] ist bekannt, dass der Ladungstransfer beim Ethidium an die Orientierungsrelaxation gekoppelt ist. Somit ist für den Ladungstransfer in Ethidium-Akzeptor-System eine Umorientierung des Ethidiums erforderlich.

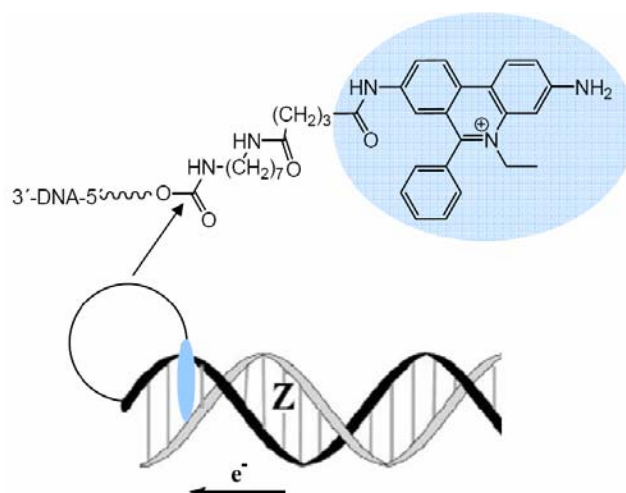


Abbildung 2-23: Schematische Darstellung des Ethidium-Deazaguanin Systems von Barton/ Zewail *et al.*^[55]

Basierend auf den Ergebnissen den zeitaufgelösten Messungen von Barton/ Zewail *et al.*^[55], können folgende Rückschlüsse gezogen werden: Bei Verwendung eines rigiden Ethidiumnukleotids ist der Ladungstrfers stark distanzabhängig. Diese Beziehung zwischen Ladungstransfer und Moleküldynamik wird als mechanistisches Konzept verstanden und als *Gating Effect* bezeichnet.^[55, 122] Die Tatsache, dass der oxidative Lochtransfer sowie der reduktive Elektronentransfer über ein Basenpaar im ps-Bereich ablaufen, zeigt, dass das Ethidium-Chromophor elektronisch stark mit dem Basenstapel koppelt. Die Amplitude dieser schnellen Zeitkomponente entspricht dem Anteil an Molekülen, die im angeregten Zustand keinerlei Umorientierung eingehen müssen, sondern unmittelbar am Ladungstransfer teilnehmen. Ein effizienter Ladungstransfer über große Distanzen ist aufgrund des rigiden Ethidiumnukleotids stark eingeschränkt bzw. nicht möglich, da dies ein Ausschöpfen der konformationellen Freiheitsgrade voraussetzen würde.

In Experimenten zum Elektronentransfer durch photoangeregtes Ethidium kann 5-Nitroindol (**N**) oder Methylviologen (**M**) als Ladungsakzeptor verwendet werden.^[197-199] 5-Nitroindol (**N**) hat ein Reduktionspotential von $E^0(\text{N}/\text{N}^+) = -0.32 \text{ V}$ ^[319] und nach der *Rehm-Weller-Gleichung* ergibt sich für den reduktiven Elektronentransfer eine Triebkraft für ΔG von ca. -0.2 eV . Dieser Wert ist mit der Triebkraft für den oxidativen Lochtransfer zwischen Ethidium und Deazaguanin vergleichbar.^[153] Die Auswertung der Ergebnisse ergab, dass der Ladungstransfer im Ethidium-Nitroindol-System eine ähnlich starke Distanzabhängigkeit, wie im Ethidium-Deazaguanin-System, zeigt (s. Abbildung 2-24).

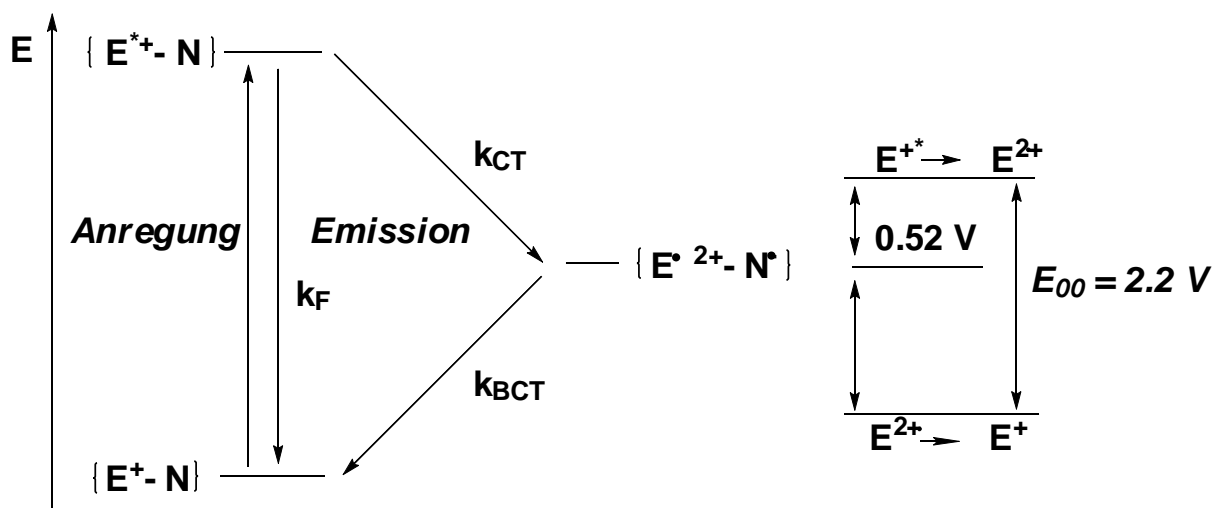


Abbildung 2-24: Photoangeregtes Ethidium als Reduktionsmittel im System Ethidium-Nitroindol. Erläuterungen: k_{ET} : Rate des reduktiven Elektronentransfers; k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

Fromherz *et al.* ^[197] und Wagenknecht *et al.* ^[201] konnten zeigen, dass die Fluoreszenz von interkaliertem Ethidium in DNA durch externes Methylviologen (**M**) aufgrund eines Elektronentransfers gelöscht wird. Die Rate des Elektronentransfers konnte mit $k_{\text{ET}} = 1.1 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Durch Elektronentransfer wird dabei das doppelt positiv geladene Ethidiumradikal E^{2+} erzeugt, das dann Guanin oxidieren kann und zu Strangbrüchen führt.

2.2 Experimentelle Methoden zur Untersuchung des photoinduzierten Ladungstransfers in DNA

2.2.1 Optische Spektroskopie

UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Für die Untersuchung der Ladungstransfereigenschaften in Oligonukleotiden spielen die UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie die wichtigste Rolle.

Mittels der UV/Vis-Spektroskopie verfolgt man die $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ und intramolekularen Ladungstransferübergänge der aromatischen Moleküle, da diese überwiegend im sichtbarem Bereich stattfinden. Diese Prozesse sind sehr schnell (10^{-15} s).

Die Relaxationsprozesse sind im Vergleich zur Anregung deutlich langsamer. Diese finden in Form von Lumineszenz oder thermische Relaxation statt. Die Lumineszenz kann als Fluoreszenz (10^{-10} s) oder als Phosphoreszenz (bis mehreren Sekunden) relaxieren. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit

lag auf der Interpretierung der Fluoreszenz. Diese ist von vielen Faktoren abhängig. Sie hängt z. B. vom pH-Wert, Lösungsmittel- und Konzentrationseffekt als auch von der Wechselwirkung mit benachbarten Molekülen ab. Die Moleküle werden mit Quantenausbeute (Φ_F) und Fluoreszenzlebensdauer (τ) charakterisiert. Die Quantenausbeute ist definiert als der Anteil der Fluoreszenzintensität (k_F) aus der Summe aller strahlenden und strahlungslosen Prozesse (Σk_R) des angeregten Chromophors (s. Gleichung 2-7).

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum k_R} \quad (\text{Gleichung 2-7})$$

Experimentell wird die Quantenausbeute (Φ_F) durch die Messung der eingestrahnten und emittierten Lichtintensität bestimmt. Die Berechnung von Φ_F erfolgt nach Gleichung 2-8. Diese berechnet sich aus dem Verhältnis der integrierten Fluoreszenzintensität im Vergleich zur bekannten Φ_F der Referenzsubstanz.

$$\Phi_F(P) = \Phi_F(R) \frac{A(R) \cdot n_D^2(P) \cdot F(P)}{A(R) \cdot n_D^2(R) \cdot F(R)} \quad (\text{Gleichung 2-8})$$

Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute
A	Absorption
n_D	Brechungsindex des Lösungsmittels
F	Integrierte Fluoreszenzintensität
P	Probensubstanz
R	Referenzsubstanz

Die Lebensdauer τ gibt die mittlere Lebensdauer eines Moleküls im angeregten Zustand wieder und ist der reziproke Wert der Ratenkonstante der Fluoreszenzemission k_F (s. Gleichung 2-9).

$$\tau = \frac{1}{k_F} \quad (\text{Gleichung 2-9})$$

Aus der mittleren Lebensdauer τ des angeregten Zustandes kann, bei zeitaufgelösten Messungen der Donor-Akzeptor-Systeme, die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers (k_{ET}) bestimmt werden (s. Gleichung 2-10). Als Referenz für die Lebensdauer des angeregten Zustandes (τ_0), wird nur der fluorophore Donor vermessen.

$$k_{\text{ET}} = \frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \quad (\text{Gleichung 2-10})$$

Die Fluoreszenz ist nur bei verdünnten Lösungen ($< 10^4$ mol/l) mit der Konzentration linear. Bei höheren Konzentrationen bilden sich so genannte Aggregationseffekte. Diese Chromophorwechselwirkungen schlagen sich auf die Fluoreszenzintensitäten nieder, die sie damit verfälschen. Eine andere Art von Chromophorwechselwirkungen treten bei sog. Exciplexen auf.^[202] Diese entstehen wenn ein angeregtes Molekül (A^*) mit einem anderen Molekül im Grundzustand (A) reagiert und ein stabiles Dimer (A^*A) bzw. Exciplex bildet. Dabei teilen sich beide Moleküle die Anregungsenergie und Ladung. Durch diese Aufteilung wird die Bildungsenergie frei. Dies führt dazu, dass die Excimerfluoreszenz, im Vergleich zur Monomerfluoreszenz, rotverschoben ist. Nach der Fluoreszenzemission zerfallen die Exciplexe wieder, da sie im Grundzustand aufeinander repulsiv wirken (s. Abbildung 2-25).

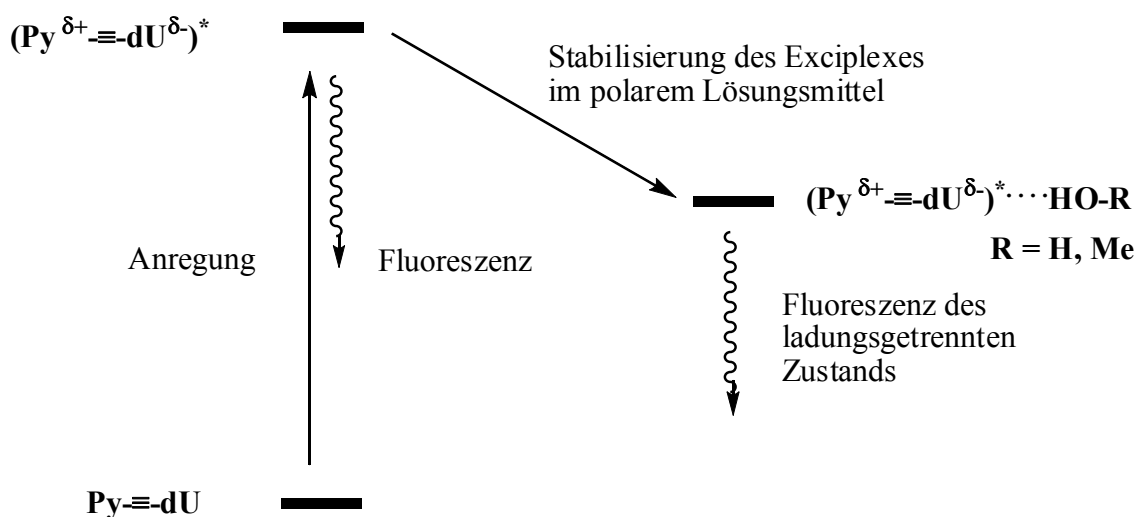


Abbildung 2-25: Schematische Darstellung der Excimerbildung am Beispiel Py-≡-dU (28, vgl. dazu Kapitel 5).

Ein Exciplex kann auch als erster Zwischenschritt des Elektronentransfers betrachtet werden. Die Exciplexe sind spektroskopierbar, wie z. B. beim 5-(1-Pyrenylethynyl)-2'-desoxyuridin (Py-≡-dU, 28). Dieses Nukleosid zeigt eine typische Excimerfluoreszenz, die durch protische Lösungsmittel, wie MeOH, stabilisiert wird.^[203] Dies führt im Vergleich zu aprotischen Lösungsmitteln zu einer deutlich geringeren Fluoreszenzintensität.

Jeder Vorgang, der zu einem Rückgang der Fluoreszenzintensität führt, wird als Löschprozess oder *Quenching* bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit sind der Elektronentransfer und der Energietransfer als Ursache der Fluoreszenzlöschung.

Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsspektroskopie^[204]

Die elektronischen Eigenschaften können, zusätzlich zur stationären optischen Spektroskopie, auch mit zeitaufgelöster Transientenabsorptionsspektroskopie verfolgt werden (s. Abbildung 2-27). Mit dieser Methode, die auch als *Pump-Probe*-Spektroskopie bezeichnet wird, ist es möglich die Absorption von kurzlebigen Zuständen (transiente Absorption) zu untersuchen. Dabei können Absorptions- und Relaxationsprozesse verfolgt werden. Zur Zeit liegt die Untergrenze der Zeitauflösung bei etwa 10 fs. Der Chromophor wird über einen kurzen Laserpuls mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt („*Pump*“). Ein zweiter, unabhängiger Laserpuls beliebiger Wellenlänge („*Probe*“) wird in variablen Zeitabständen durch die Probe geschickt und kann von den entstandenen intermediären Zuständen absorbiert werden (s. Abbildung 2-26).

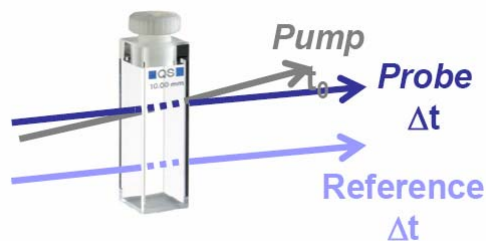


Abbildung 2-26: Prinzip der *Pump-Probe*-Spektroskopie.^[204] Mit einem kurzen Laserpuls wird der Chromophor mit entsprechende Wellenlänge angeregt (*Pump*). Ein zweiter, unabhängiger Laserpuls beliebiger Wellenlänge (*Probe*) wird in variablen Zeitabständen durch die Probe geschickt und durch die entstandenen Intermediaten absorbiert. Als Referenz dient die Absorption des Grundzustands (*Reference*) mit der die Repopulationsrate dieses Zustands bestimmt wird. Somit erhält man die Rate des Rückladungstransfers und der Lebenszeit des angeregten Zustands.

Daraus können folgende Rückschlüsse gezogen werden:

- Liegt der Abfragepuls ausserhalb der Fluoreszenzbande, kann die Besetzungswahrscheinlichkeit jedes beliebigen intermediären Zustands (z. B. des ladungstrennten Zustandes) ermittelt werden.
- Liegt der Abfragepuls innerhalb der Fluoreszenzbande, kommt es zu einer stimulierten Emission des angeregten Zustands und es lässt sich die Entvölkerungsrate dieses Zustands (S_1) ermitteln.
- Liegt der *Probe*-Puls im Bereich der Grundzustandsabsorption, lässt sich analog der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie die Rate des Rückladungstransfers k_{BCT} bestimmen.

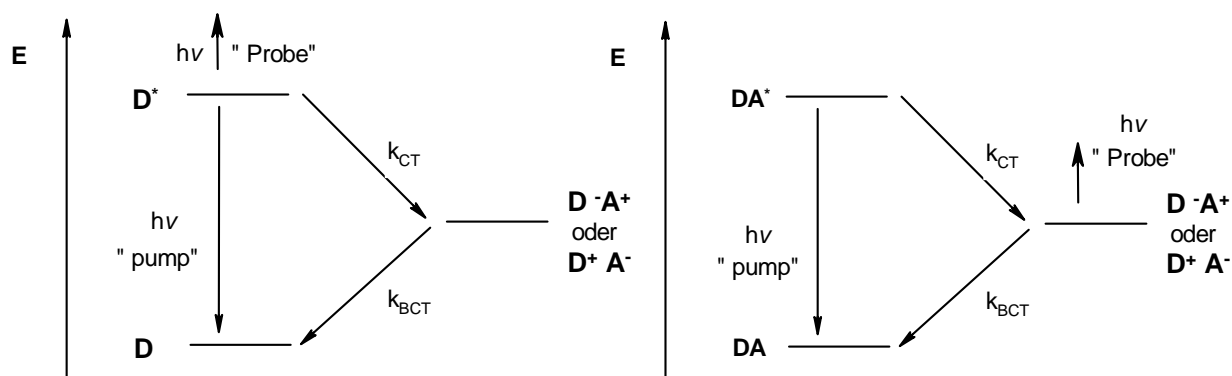


Abbildung 2-27: Mit der zeitaufgelösten *Pump-Probe*-Laserspektroskopie ist es möglich, verschiedene Intermediate zu beobachten und die Geschwindigkeiten der unterschiedlichen photoinduzierten Prozesse zu ermitteln; k_{CT} = Rate für den Ladungstransfer, k_{BCT} = Rate für den Rückladungstransfer.

Wird ein Weisslichtkontinuum als *Probe*-Puls eingesetzt, können alle Wellenlängen im Bereich von 350-1000 nm gleichzeitig abgefragt werden können. Die Absorption einer Probe kann mit oder ohne vorherige Anregung gemessen werden und wird als Änderung der optischen Dichte gegen die Zeit aufgetragen. Die Messwerte können, abhängig von der Absorption, stimulierte Emission, *Ground State Bleaching* oder Rücktransfer in den Grundzustand, also positiv oder negativ sein. Die Amplituden und Lebensdauer der Spezies aus den erhaltenen Spektren liefern die Raten von Fluoreszenz, Ladungstrennung und Ladungsrekombination.

2.2.2 Cyclovoltammetrie^[205] und Spektroelektrochemie^[206]

Mit der Cyclovoltammetrie lassen sich die Redoxpotentiale einer Verbindung bestimmen. Diese werden als das Standardpotential des elektrochemischen Übergangs wiedergegeben. Das Standardpotential (s. Gleichung 2-11), auch Halbstufenpotential genannt, ist ein Mittelwert des anodischen (E_p^{ox}) und kathodischen Peakpotentials (E_p^{red}).

$$E_{1/2} = \frac{E_p^{ox} + E_p^{red}}{2} \quad (\text{Gleichung 2-11})$$

Man verwendet eine Drei-Elektroden-Anordnung aus Arbeits-, Gegen-, und Referenzelektrode. Die Messung erfolgt unter Argonatmosphäre unter Verwendung von trockenen organischen Lösungsmitteln. Um die Leitfähigkeit der Lösung zu erhöhen, wird Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAH) zugesetzt. Die Vorgänge an der Arbeitselektrode werden mit Hilfe der Nernst-Gleichung und den Fickschen Gesetzen der Diffusion beschrieben.

Die Spektroelektrochemie ist eine Messmethode, die einer Kombination der CV und UV/Vis-Spektroskopie ähnelt. Mit dieser Meßmethode ist es möglich, in einer speziellen Zelle bei angelegten Potentialen, eine genügend hohe stationäre Konzentration von Radikalkationen zu erzeugen, um ihre auf Absorptionseigenschaften zu untersuchen. Bei der Zelle handelt es sich, wie bei der CV, um eine Drei-Elektroden-Anordnung, die über den Potentiostaten miteinander verbunden sind. Die Zelle ist eine ovale Quarzglasküvette, in der ein Goldnetz (Arbeitselektrode) zwischen zwei dünnen Glasplatten eingespannt ist. Aufgrund des Zeitaufwands eignet sich diese Methode nur für sehr stabile Radikale (s. Abbildung 2-28).

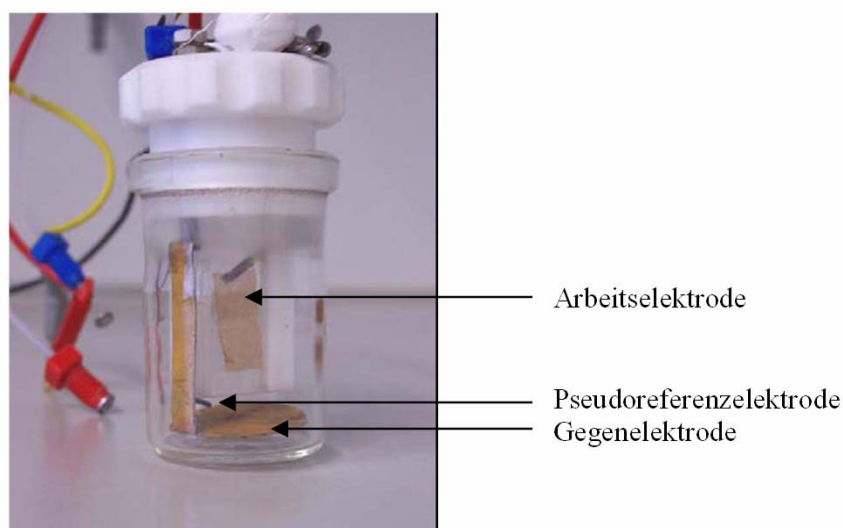


Abbildung 2-28: Die Messzelle für die Spektroelektrochemie besteht aus einer Quarzglasküvette, in der zwischen zwei Quarzglasplatten ein Goldnetz (Arbeitselektrode) eingespannt ist. Alle Elektroden sind mit einem Potentiostaten verbunden.

2.3 Synthetische Methoden

2.3.1 DNA-Synthese

Die Darstellung der Oligonukleotide erfolgt mittels der DNA-Festphasensynthese nach Letsinger.^[207, 208] Das am häufigsten verwendete Protokoll für die automatisierte Festphasensynthese ist die Phosphoramidit-Methode.^[209, 210] Als Träger der festen Phase wird sog. *Controlled-Pore-Glass* (CPG) eingesetzt. Die Oberfläche ist über einen Aminlinker mit Bernsteinsäure belegt. Das erste Nukleosid der Sequenz wird über eine Esterbindung an der 3'-OH-Gruppe mit dem CPG verknüpft. Die 5'-OH-Gruppe des Nukleosids ist trityliert und gegebenenfalls an der exocyclischen Aminofunktion der DNA-Base geschützt.

Die DNA-Synthese erfolgt von in 3'→5'-Richtung. Man verwendet temporäre und permanente Schutzgruppen. Als temporäre Schutzgruppe für die 5'-OH-Gruppe wird eine Dimethoxytritylgruppe (DMT) verwendet, die unter sauren Bedingungen vor jedem Kupplungsschritt entfernt wird. Die permanenten Schutzgruppen werden erst nach Abschluss der Oligonukleotidsynthese bei der Abspaltung des Oligonukleotids vom Träger mit Ammoniak entfernt.

Die Synthese erfolgt nach, in vier sich wiederholenden Schritten (s. Abbildung 2-29):

- i) **Detritylierung:** Die 5'-OH-Gruppe des am Träger immobilisierten Nukleosids wird mit 2% Dichloressigsäure in DCM entschützt.
- ii) **Kupplung:** Die Kupplung mit dem Phosphoramidit des nächsten Nukleosids findet in wasserfreiem Acetonitril mit Tetrazol statt. Tetrazol fungiert als schwache Säure und überführt durch Protonierung am Stickstoff die Diisopropylaminofunktion in eine gute Abgangsgruppe.
- iii) **Capping:** Die 5'-OH-Gruppen, die nicht reagiert haben, werden durch Essigsäureanhydrid, DMAP und 2,6-Lutidin in THF acetyliert und somit blockiert. Dadurch wird verhindert, daß es zu unerwünschten Folgereaktionen kommt.
- iv) **Oxidation:** Durch Iod wird der Phosphit(III)triester in den Phosphor(V) säuretriester überführt. 2,6-Lutidin wird als Base zugesetzt, um entstehenden Iodwasserstoff abzufangen.

Nach erfolgter Synthese werden die Oligonukleotide mit wässriger konzentrierter NH_4OH -Lösung bei 55°C vom CPG abgespalten. Dabei werden zugleich die Schutzgruppen an den exozyklischen Aminofunktionen der Basen und die Cyanoethoxy-Schutzgruppen an den Phosphaten mit abgespalten. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels semi-präparativer HPLC.

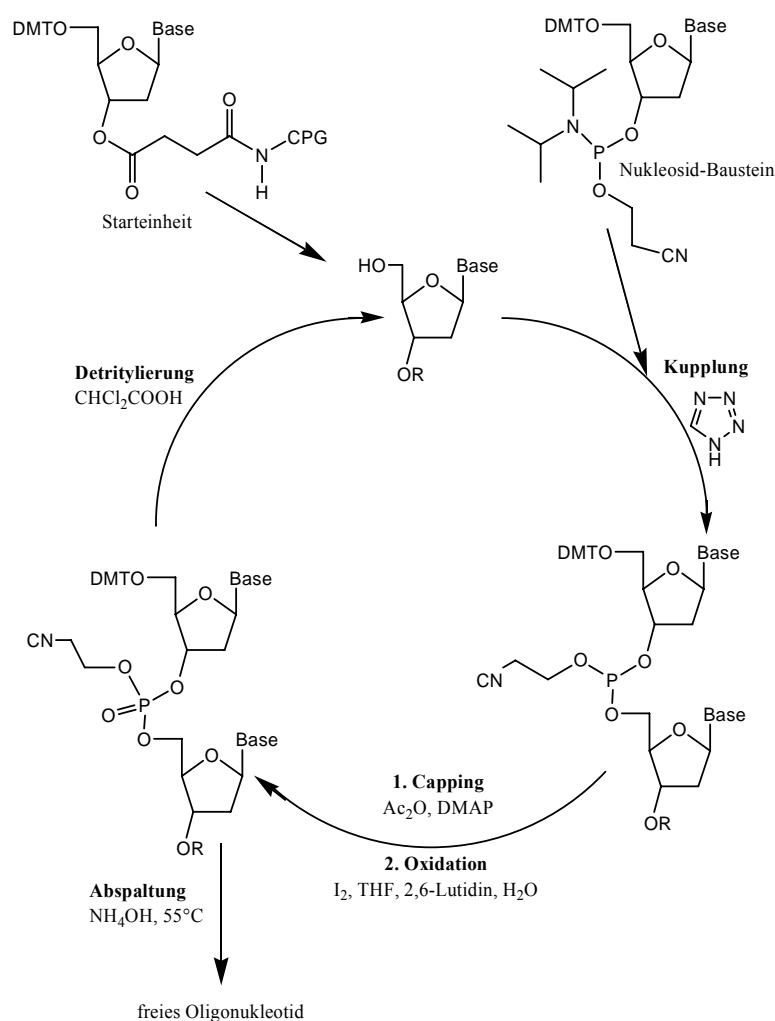


Abbildung 2-29: Schematischer Zyklus für die Phosphoramiditmethode der DNA-Synthese.

2.3.2 Click-Chemie^[336]

Der kovalente Einbau der redoxaktiven Sonde kann auch mittels der Click-Chemie erfolgen. Dies geschieht über eine 1,3-dipolare Cycloaddition, bei der Azide mit terminalen Alkinen in Anwesenheit der Cu(I)-Ionen zu einem 1,2,3-Triazol reagieren. Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Festphasensynthese ist, dass die Modifikation der Oligonukleotide postsynthetisch erfolgen kann. Dies kommt vorallem den basenlabilen Fluoreszenzfarbstoffen zugute, bei denen das Problem der Basizität bei der Abspaltung umgangen werden kann. Ist erst einmal ein Alkin-Linker in den Oligonukleotid-Strang eingeführt, kann er zur Modifizierung mit den verschiedensten Markern und Sonden herangezogen werden (s. Abbildung 2-30).

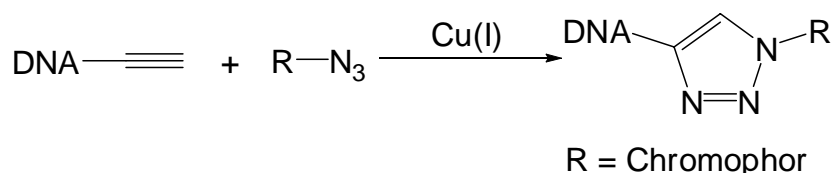


Abbildung 2-30: Allgemeines Schema der Modifikation der Oligonukleotide via Click-Chemie.

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Markierung von Oligonukleotiden mittels der Festphasensynthese beschäftigt, wird nicht näher auf die Click-Chemie näher eingegangen.

2.3.3 Palladiumkatalysierte Kreuzkupplungen

Zur Knüpfung der C-C-Bindung zwischen der Nukleobase und dem Chromophor stehen mehrere Palladium-katalysierte Kreuzkupplungsmethoden zur Verfügung.^[211] An Nukleosiden sind hauptsächlich die Heck-,^[212] Stille-,^[213, 214] Sonogashira-^[215] und Suzuki-Miyaura-Kupplung^[216, 217] angewendet worden.

Das allgemeine Prinzip der palladiumkatalysierten Kreuzkupplungen folgt dem gängigen Katalysezyklus für palladiumkatalysierte Kreuzkupplungen:

- i) Oxidative Addition
- ii) Transmetallierung
- iii) Reduktive Eliminierung

In dieser Arbeit sollen bei der Darstellung der 5-substituierten Uridine die Suzuki-Miyaura-,^[218] Masuda-,^[219] und Sonogashira-Kupplung^[220-224] angewendet werden. Die Synthese des Phenothiazin-Phosphoramidits **27** erfolgt aus 5-Iod-2'-desoxyuridin (**28**) und Boronsäurederivates **24** nach Suzuki-Miyaura (s. Abbildung 2-31). Die oxidative Addition erfolgt mit **28** und Pd(dppf)Cl₂ als Pd-Katalysator. Die Vorteile dieses Katalysators im Vergleich zu Pd(PPh₃)₄ sind die besseren Ausbeuten und weniger Nebenprodukte, die durch Liganden verursacht werden. Dieses Problem wird beim Pd(dppf)Cl₂-Katalysator durch den wasserlösliche Pd-Liganden (1,1'-Bis(diphenylphosphino)-ferrocen) umgangen und somit die Aufarbeitung vereinfacht. Die Aktivierung des Borsäurederivates für die Transmetallierung erfolgt durch eine starke Base unter Ausbildung einer tetravalenten anionischen Borspezies. Nach einer Isomerisierung erfolgt eine reduktive Eliminierung zum Endprodukt. Die Darstellung des Boronsäurederivates **24** erfolgt aus 3-Brom-10-methylphenothiazin (**23**) und Pinakolboran nach Masuda.

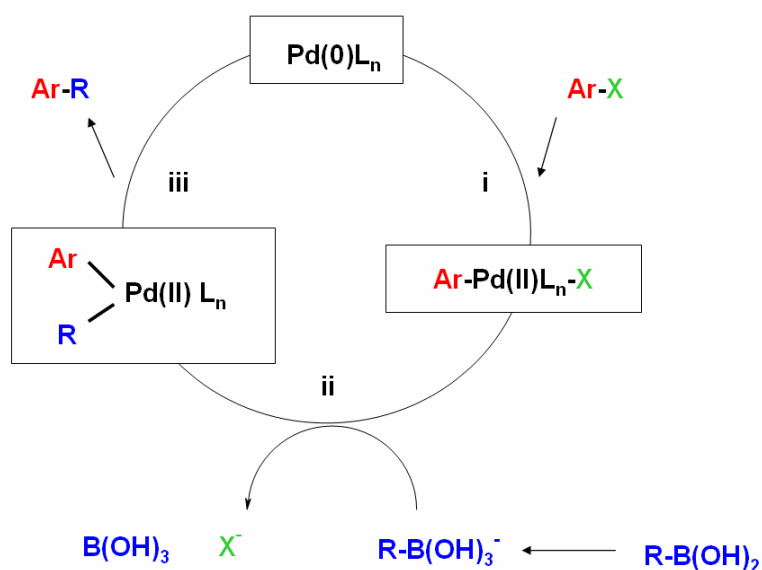


Abbildung 2-31: Katalysezyklus für die Pd-katalysierte Suzuki-Kupplung.

Die Darstellung des Pyren-Phosphoramidits **32** erfolgt nach der Sonogashira-Kupplung (s. Abbildung 2-32). Hier werden Alkinpyrene **30** mit 5-Iod-2'-desoxyuridin (**28**) gekuppelt.^[81, 215] Für die oxidative Addition wird aus den genannten Gründen Pd(dppf)Cl_2 in Kombination mit Kupfer(I)-Salzen bevorzugt. Für die Aktivierung der Alkine wird als Base Triethylamin verwendet. Das entstandene Anion wird durch den Kupfer(I) Co-Katalysator komplexiert und auf den Palladium-Komplex transmetalliert. Nach einer Isomerisierung erfolgt eine reduktive Eliminierung zum Endprodukt.

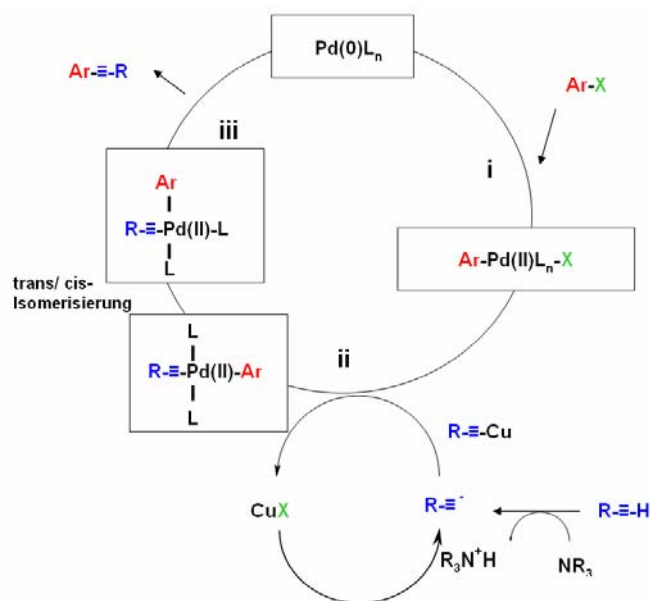


Abbildung 2-32: Katalysezyklus für die Pd-Cu-katalysierte Sonogashira-Kupplung.

2.4 Tryptophan als biologischer Lochakzeptor

Tryptophanradikale treten in vielen biologischen Prozessen auf. Insbesondere konnten dessen Radikale u.a. in den DNA-bindenden Proteinen,^[225-227] DNA-Photolyase^[166, 167, 171-173] oder in der Ribonukleotid-Reduktase^[228-230] nachgewiesen werden. Tryptophan fungiert bei oxidativen Prozessen als Radikalfänger bzw. Lochakzeptor. Diese Eigenschaften macht man sich auch bei der Untersuchung des oxidativen Ladungstransportes durch DNA zu Nutze, denn es ist bekannt, dass Tryptophan ein niedrigeres Oxidationspotential besitzt $E_{ox}(\text{Trp}/\text{Trp}^{*+}) = 1,0 \text{ V}^{[35, 231]}$ als Guanin $E_{ox}(\text{G}/\text{G}^{*+}) = 1,3 \text{ V}^{[232]}$. Dieses niedrige Oxidationspotential des Tryptophans liegt an dem leicht oxidierbaren Indol. Nach der Oxidation erfolgt eine Deprotonierung, die das Indolradikal stabilisiert. Dieser Mechanismus wird auch als PCET (*Proton-Coupled Electron Transfer*) bezeichnet.^[321] Die anschließende Stabilisierung des Radikals erfolgt durch das aromatische System (s. Abbildung 2-33).

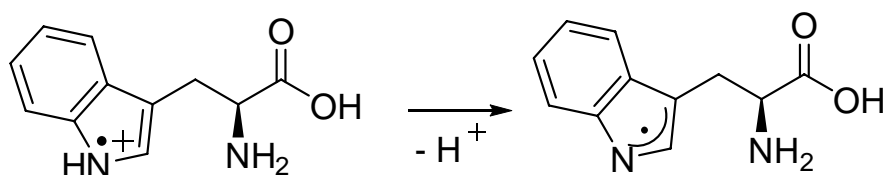


Abbildung 2-33: Abfangreaktion des Tryptophans als Lochakzeptor.

Aufgrund des niedrigen Oxidationspotentials eignet sich Tryptophan ideal als Lochakzeptor für die Untersuchung des oxidativen Lochtransportes in DNA. Die tryptophanbasierende Lochakzeptormodelle reichen von modifizierten DNA-Bindungsproteinen^[225-227] bis zu kurzen DNA-Bindungstriptiden.

Für die Untersuchung des Ladungstransportes in einem Protein-DNA-Komplex wurde als DNA-Bindungsprotein (*Base-Flipping*-Enzym) der Wildtyp der Cytosin-Methyltransferase *HhaI* verwendet. Das Protein fungiert eigentlich als ein Reparaturenzym, kann aber auch den oxidativen Lochtransportes in der DNA inhibieren. Dieses Protein erkennt die DNA-Sequenz 5'-GCGC-3' und bindet an die DNA. Dabei wird ein *Base-Flipping*-Komplex gebildet, indem das Cytosin aus dem Basenstapel herausgedreht wird. Die gebildete Lücke im Basenstapel wird durch eine Glutamin-Seitenkette des Proteins gefüllt. Diese verursachte Störung in der DNA hindert den Ladungstransfer durch die Proteinbindung merklich. Wiederholt man den Versuch mit einer Mutanten des Enzyms (Q237W), die anstatt einer Glutamin- eine Tryptophanseitenkette insertiert ist, so schließt sich die elektronische Lücke wieder und der Ladungstransport ist wieder möglich, da Tryptophan mit seiner

planaren Indolseitenkette im Basenstapel interkaliert ist und Cytosin ersetzt (s. Abbildung 2-34).

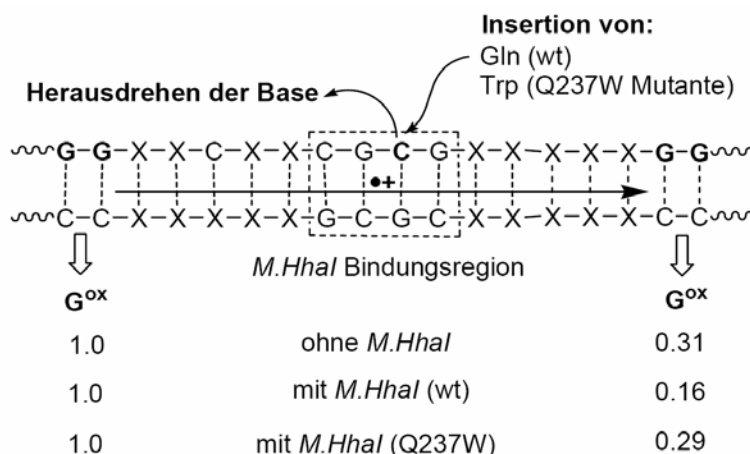


Abbildung 2-34: Vergleich des oxidativen Lochtransportes in DNA ohne Zugabe von *HhaI*, unter dem Einfluss von Wildtyp *HhaI* und des Q237W-Mutanten. Die Anzahl der Oxidationsereignisse in 5'-Richtung (Werte normiert gegen Anzahl der G_{ox} -Ereignisse in 3'-Richtung) korreliert mit der Ladungstransfereffizienz (G_{ox} = Oxidationsprodukte von dG).

So wurden zum besseren Verständnis die kurzen DNA-Bindungspeptide Lys-Trp-Lys und Lys-Tyr-Lys als Lochakzeptoren (s. Abbildung 2-35) verwendet.^[225-227] Diese Tripeptide binden bevorzugt an A-T-reichen Sequenzen.^[233-241] Der Lochtransport wird *in situ* mittels *Flash-Quech*-Technik mit interkalierten Ruthenium-Komplexen induziert. Anschließend konnte sowohl die Bildung von Guaninradikalkationen als auch von Tryptophan- und Tyrosinradikalkationen durch Transientenabsorptionsspektroskopie nachgewiesen werden. Oxidationsfolgeprodukte der beteiligten Radikalkationen wurden mittels Gelelektrophorese und HPLC analysiert.

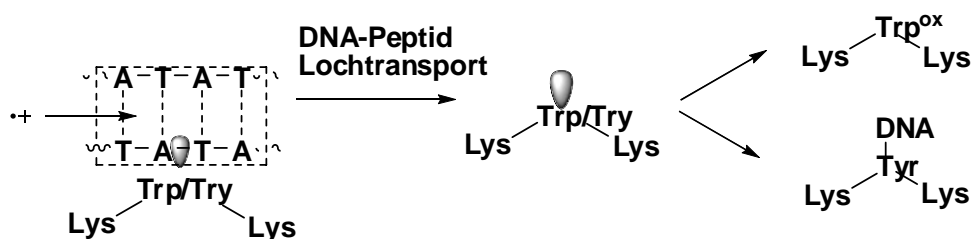


Abbildung 2-35: Versuche von Barton *et al.* zum oxidativen Lochtransport in DNA von einem Ru(III)-Komplex zu interkalierendem Tryptophan oder Tyrosin. Ru(III) injiziert ein Elektronenloch im DNA Basenstapel.

Ähnliche Arbeiten mit DNA-Bindungspeptiden als DNA-externe Lochakzeptoren wurden im Arbeitskreis Wagenknecht *et al.* durchgeführt.^[242] Zur photoinduzierten Erzeugung der Ladung wurden hierbei die Py-dU-modifizierte Oligonukleotide verwendet. Die DNA-Bindungspeptide enthielten folgende Sequenz: Lys-Lys-Lys-Nb (pNb-KKK), Lys-Trp-Lys-Nb (pNb-KWK) und Lys-

Try-Lsy-Nb (pNb-KYK). Alle Tripeptide trugen zusätzlich den para-Nitrobenzoyl-Rest (Nb). Dieser fungiert aufgrund seines geringen Reduktionspotentials, $E_{\text{Red}}(\text{p-Nb}/\text{p-Nb}^{\bullet-}) = -0.46 \text{ V}^{[243, 244]}$, als Elektronenakzeptor. Die Untersuchungen ergaben, dass in pNb-KKK vom ladungsgetrennten Zustand $\text{Py}^{\bullet+}\text{-dU}^{\bullet-}$ unspezifische oxidative Strangbrüche auftraten, da nach der Bestrahlung das Elektron aufgefangen wurde und nicht die positive Ladung. In Anwesenheit von Tryptophan (pNb-KWK) und Tyrosin (pNb-KYK) konnten keine Strangbrüche beobachtet werden, da sowohl die positive als auch die negative Ladung abgefangen wurde (s. Abbildung 2-36).

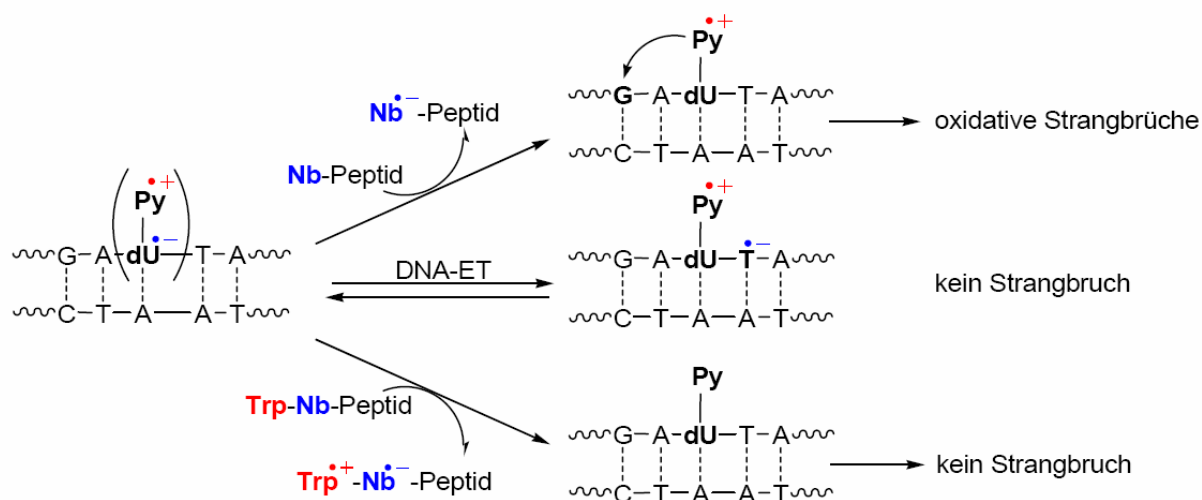


Abbildung 2-36: Ladungstransport Versuche zwischen Py-dU-modifizierten DNA und Nb-modifizierten Peptiden.

Tryptophan spielt auch bei der Photoaktivierung der DNA-Photolyasen eine wichtige Rolle.^[245] Es ist bekannt, dass die Photolyasen über den reduktiven Elektronentransfer die mutagene und cancerogene T \hat T-Dimere in DNA in Monomere zurückspalten. Für die Reparaturreaktion benötigt die DNA-Photolyase als Elektronendonator den reduzierten und deprotonierten Flavin-Cofaktor ($\text{FADH}^{\bullet-}$). Die Generierung dieses katalytisch aktiven Flavinzustands ($\text{FADH}^{\bullet-}$) kann über zwei Wege erfolgen. Zum einen wird das angeregte Flavinanion mittels Energietransfer über den Pterin-Blaulichtrezeptor ($\lambda = 350 \text{ nm}$ bis 450 nm) Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder ein Deazaflavin^[191] zum $\text{FADH}^{\bullet-}$ angeregt. Nach der Spaltung der Pyrimidin-Dimere geht das angeregte Flavinanion in den semireduzierten Zustand (FADH^{\bullet}) zurück.

In DNA Photolyase der *E. coli* wurde gezeigt, dass die Reduktion des katalytischen Cofaktors von FADH^{\bullet} zu $\text{FADH}^{\bullet-}$ auch durch, in Enzymen vorhandene, Tryptophane (Trp-H) erfolgt.^[245] Dabei fungieren Tryptophane (Trp-H) als Elektronendonator und werden selbst zum Radikalkation ($\text{Trp}^{\bullet+}$) oxidiert. Die wichtigsten Tryptophane in diesem Katalysezyklus sind W382, W359 und W306. Diese stehen zum Flavin-Cofactor der Photolyase in unterschiedlicher Distanz. Aufgrund dieser

räumlichen Trennung wird zuerst zur Reduktion von FADH^\bullet zum katalytisch aktiven FADH^\bullet W382 zum Radikalkation oxidiert. Anschließend folgt ein Lochtransport vom W382-Radikalkation über das W359- zum W306-Radikalkation. Das W306-Radikalkation wird schließlich zum Tryptophanradikal (Trp-H^\bullet) deprotoniert (s. Abbildung 2-37). Als Protonenakzeptor dient Wasser.

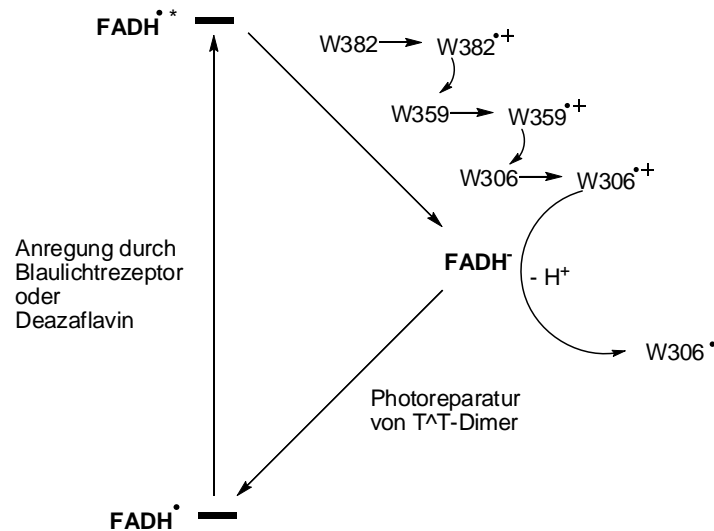


Abbildung 2-37: Schema zur Photoreduktion von FADH^\bullet zu FADH^\bullet . Zuerst wird der semireduktive FADH^\bullet durch Blaulichtrezeptor oder Deazaflavin zum $\text{FADH}^{\bullet*}$ angeregt und anschließend durch ein Tryptophan (bei *Escherichia coli* W306) zum FADH^\bullet reduziert. Dabei wird Tryptophan selbst zum Radikalkation oxidiert. Nach der Photoreparatur entsteht wieder ein FADH^\bullet , Tryptophanradikalkation wird durch einen externen Donor, z. B. Wasser, reduziert.

2.5 SNP-Detektion

Als SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) versteht man veränderte Allele, die sich gegenüber der Wildtyp-Form in nur einem einzigen Basenpaar unterscheiden.^[246-251] Falls die Reparaturenzyme diese Änderung in einer proteinkodierten Region übersehen, kommt es bei der Translation zu einer veränderten Aminosäuresequenz des zu kodierenden Proteins. Diese transitive oder transversive Substitutionen verursachen unterschiedlich starke Mutationen, die wiederum Änderungen des Phänotyps oder z. B. Krankheiten wie Krebs verursachen können. Falls diese SNP in der Keimzelle auftreten, kann es zur vererbten Krankheiten kommen. Um diese SNPs zu detektieren, wurden nicht nur viele Nachweismethoden entwickelt, sondern auch separate Datenbanken, wie *dbSNP database* oder *Human SNP Database* publiziert. Bis heute sind über 2 Millionen SNP-Stellen bekannt.^[252]

Die SNP-Nachweismethoden kann man in zwei große Bereiche einteilen, in die Hybridisierungsmethoden und die enzymatischen Methoden. Aufgrund der vielfältigen Ansatzmöglichkeiten, werden hier nur wichtigsten Methoden, die auf Fluoreszenzeigenschaften basieren, beschrieben.^[251]

2.5.1 Hybridisierungsmethoden^[251, 253, 254]

Mit der Hybridisierungsmethode wird die destabilisierende Eigenschaft der fehlgepaarten DNA, im Vergleich zu der richtig gepaarten DNA untersucht. Zu den wichtigsten gehören der DNA-*Microarray* und die DASH-Methode.

Allelspezifische Hybridisierung mit DNA-*Microarrays*^[255-258]

Die DNA-*Microarrays* sind eine miniturierte Anordnung einer Vielzahl von einzelnen Spots, die definierte, kovalentverknüpfte Sondenmoleküle enthalten. Die hohe Belegungsdichte (100 000 Spots/ cm²) und die geringe Probenvolumina (< 1 µl) ermöglichen einen hohen Durchsatz. Diese werden vor allem in der klinischen Diagnostik und Pharmagenomik angewendet (s. Abbildung 2-38).

Für die SNP-Detektion werden sog. Oligonukleotid-*Microarrays* verwendet, die mit allelspezifischen Oligonukleotiden (ASOs, *Allele-Specific Oligonucleotides*) versetzt sind. Nach dem Hybridisierungsprinzip wird dann die Targetprobe auf die Genotypisierung geprüft. Nach der Aufarbeitung werden die *Microarrays* mit unterschiedlichen Techniken ausgelesen, z. B. mit TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*).

Nachteil der *Microarrays* ist, dass die Hybridisierungsmethode nicht nur von den Hybridisierungsbedingungen abhängig ist, sondern auch von der Sequenz des geprüften Einzelstranges und der sekundären Struktur,^[259] die u. U. eine vollständige Hybridisierung verhindern. Aufgrund dieses Problems leidet die Nachweismethode, die eine genaue SNP-Detektion unmöglich macht (große Fehlerquote zwischen heterozygoten und homozygoter SNP-Genotypisierung). Die neueste Untersuchungen zeigen aber, dass diese Fehlerquote durch den Austausch von DNA-ASOs, durch PNA- oder LNA-ASOs deutlich reduziert wird. Grund für diese Verbesserung ist, dass diese PNA- bzw. LNA-ASOs eine viel höhere Affinität zur komplementären Target-DNA haben.

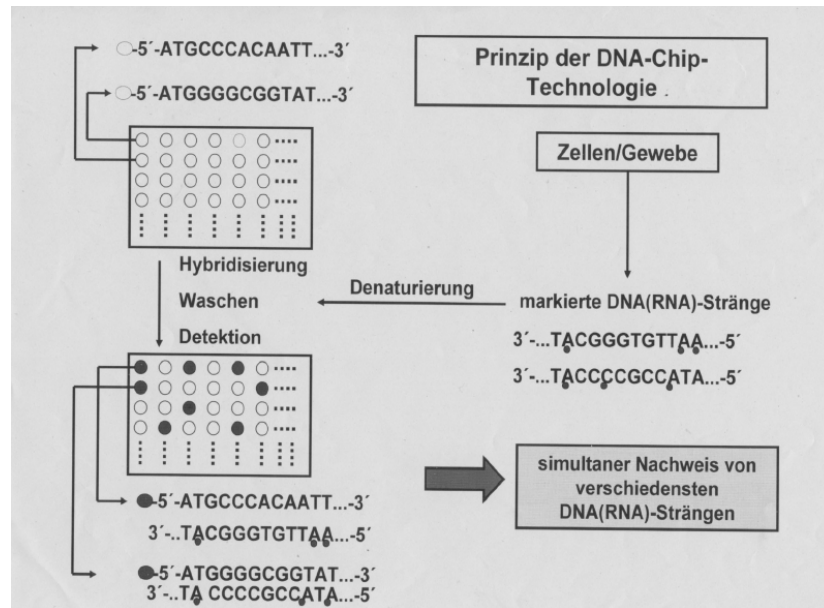


Abbildung 2-38: Prinzip der Durchführung eines *Microarray*-Experiments.

DASH (*Dynamic Allele-Specific Hybridization*)^[251]

Das Prinzip dieser Hybridisierungsmethode basiert auf einer unterschiedlichen thermischen Stabilität zwischen dem richtig gepaarten und fehlgepaarten Duplex. Der DASH-Assay (s. Abbildung 2-39) wird wie folgt durchgeführt. Der gewünschte Einzelstrang mit der SNP-Stelle wird zuerst isoliert. Dieser wird mittels PCR amplifiziert und mit Biotin markiert (biotinylierter PCR-Primer). Dieses Produkt wird über Streptavidin mit der Mikroplatte verknüpft. Der unerwünschte, nicht-biotinylierte Gegenstrang wird mit NaOH denaturiert und entfernt. Die Hybridisierung folgt mit der allelspezifischen Probe unter Zugabe eines Farbstoff-Interkalators, wie z. B. Sybr Green I. Die Auswertung erfolgt über die Fluoreszenzintensität, die proportional zum hybridisierten DNA-Duplex ist. Das Experiment erfolgt durch schrittweise Erhitzung bis zur vollständigen Denaturierung. Aufgrund der unterschiedlichen thermischen Stabilität zwischen richtig gepaarten und fehlgepaarten Duplexen, kommt es zum spezifischen Rückgang der Fluoreszenzintensität des Interkalators.

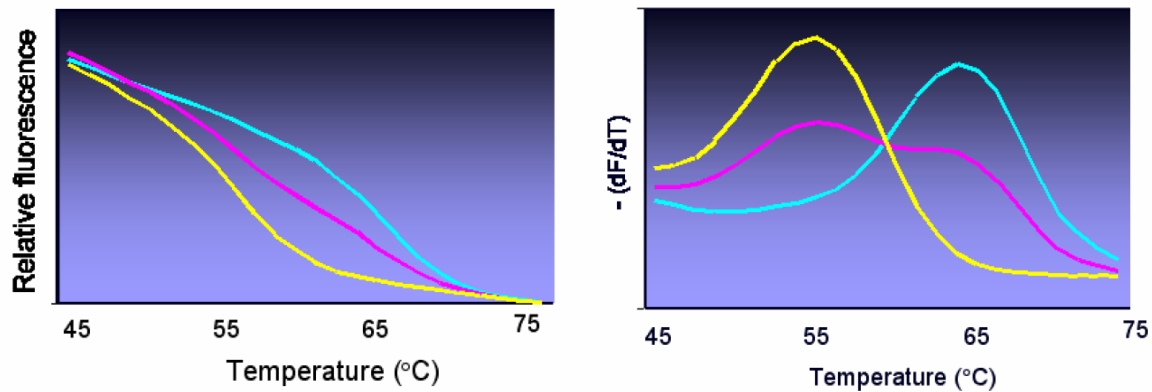


Abbildung 2-39: Links: DASH Experiment beruht auf der unterschiedlichen thermischen Stabilität zwischen dem richtig gepaarten und fehlgepaarten Duplexen in Anwesenheit eines Farbstoffinterkalators, wie Sybr Green I. Die Auswertung erfolgt über den spezifischen Rückgang der Fluoreszenzintensität des Interkalators. Rechts: Ableitung der Schmelzkurven.

2.5.2 Enzymatische Methoden

Die enzymatischen Methoden zeichnen sich durch hohe Zuverlässigkeit und Genauigkeit aus, die auf den verwendeten Enzyme oder Enzym-Assays beruht. Bis jetzt wurden Ansätze mit verschiedenen Enzymen (DNA-Polymerase, DNA-Ligase, reverse Transkriptase, Flap-Endonuklease) und eine Vielfalt an Methoden entwickelt. Nahezu alle bestehen aus drei Schritten, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), Enzym-Zugabe und spezifischer Hybridisierung, wobei es Unterschiede meist nur bei der Art der Auswertung der Ergebnisse gibt.

Homogene Assays (*TaqMan Assay*)^[260-261]

Der *TaqMan Assay* beruht auf der sequenzspezifischen Hybridisierung in Kombination mit FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Die Sequenz mit der SNP-Stelle wird am 3'-Ende mit einem kurzem Oligonukleotid (*TaqMan-Probe*) hybridisiert. Diese *TaqMan-Probe* ist mit einem Fluorophor und einem Quencher modifiziert. Nach der Hybridisierung ist die Fluoreszenz des Quenchers aufgrund des FRETs gelöscht. Anschließend wird ein Primer am 3'-Ende der zu untersuchenden Sequenz hybridisiert und mit der *Taq*-Polymerase verlängert. Die *TaqMan-Probe* wird durch den anwachsenden Primer verdrängt und durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Das hat zu Folge, dass sich die FRET Farbstoffe räumlich voneinander trennen und die Fluoreszenz steigt.

Single-Nucleotide Primer Extension und DNA-Polymerase^[262]

Die Untersuchung von SNP mittels *Single-Nucleotide Primer-Extension* wird oft auf sog. Biochips durchgeführt. Die zu untersuchende Sequenz (*Target Sequence*) ist kovalent mit der Chipoberfläche fixiert (s. Abbildung 2-40). Zu dieser Sequenz wird am 3'-Ende ein komplementärer Primer hybridisiert. Anschließend folgt die Verlängerung des Primers durch die fluoreszenzmarkierten ddNTPs (*Dideoxynucleosid Triphosphate*) mit der DNA Polymerase. Alle vier ddNTPs besitzen andere Farbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsmaxima. Aufgrund der Auswertung der Fluoreszenzeigenschaften wird eine Mutation festgestellt.

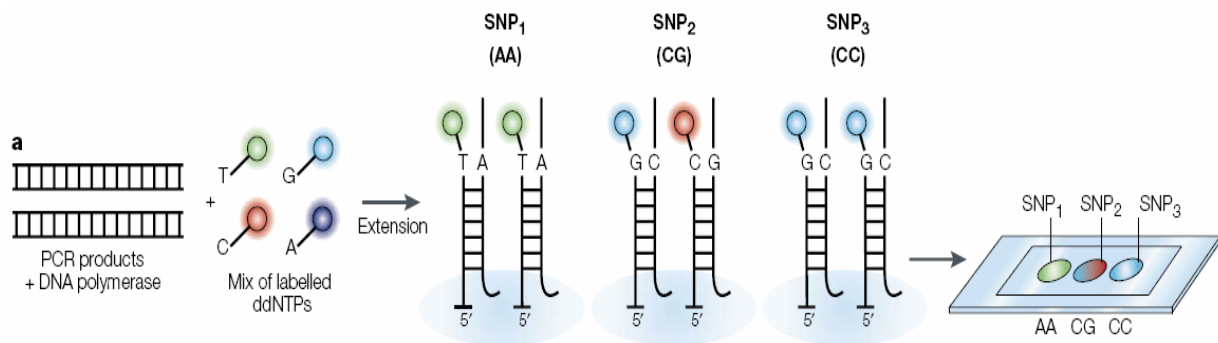


Abbildung 2-40: Prinzip des *Single-Nucleotide Primer-Extension*-Experiments

SNP Diskriminierung mit DNA-Ligase^[262-264]

Seit dem ersten Assay von *Landegren*,^[264] wurden bis jetzt viele auf DNA-Ligase basierten SNP-Nachweismethoden entwickelt. Hierbei ist die Bildung der Phosphodiesterbrücke zwischen 3'-Ende und 5'-Ende die Schlüsselreaktion.

Der erste Assay, sog. OLA (*Oligonucleotide Ligation Assay*)^[265] beruht auf der einfachen Ligation zwischen zwei kurzen allelspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär mit der Matrize hybridisiert (s. Abbildung 2-41) sind. Diese zwei Oligonukleotide sind durch das 3'-Ende und 5'-Ende voneinander getrennt. Nach Zugabe der DNA-Ligase wird zwischen dem 3'- und 5'-Ende im Falle einer richtig gepaarten Sequenz der letzten Base, am linken allel-spezifischen ON, eine Ligation durchgeführt. Ist die letzte Base dieses ON nicht komplementär, wird die Ligase nicht aktiv und der Phosphodiester wird nicht gebildet. Die Ergebnisse werden über Gelelektrophorese ausgewertet.

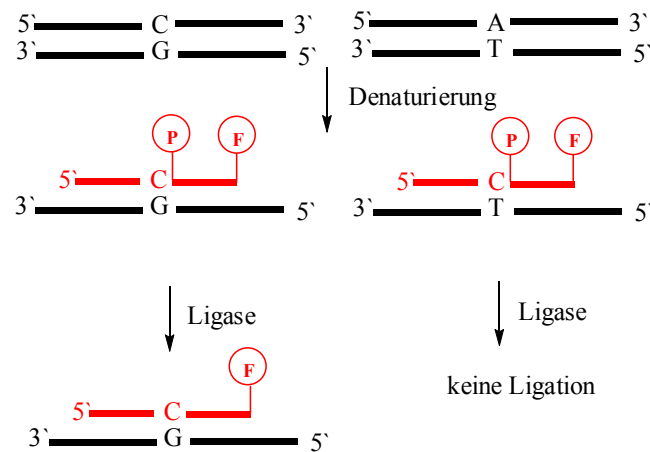


Abbildung 2-41: Ligation von zwei allel-spezifischen Oligonukleotiden mit einer DNA-Matrize.

Eine weitere Möglichkeit, eine Punktmutation nachzuweisen, ist die LDR (*Ligase Detection Reaction*) gekoppelt mit sp-FRET (*Single-Pair Fluorescence Resonance Energy Transfer*).^[266] Hier wird die auf SNP zu untersuchende DNA-Sequenz mit zwei kurzen allel-spezifischen Oligonukleotiden oder DOL (*Dye-Labeled Oligonucleotide Ligation*) hybridisiert. Beide komplementären ON besitzen einen Farbstoff. Im Falle einer Ligation werden diese zwei Einzelsequenzen zu einem *Molecular Beacon* ligiert. Anschließend wird denaturiert und es entsteht ein sog. rMB (*Reverse Molecular Beacon*), der über FRET mit einer anderen Emissionswellenlänge emittiert (s. Abbildung 2-42).

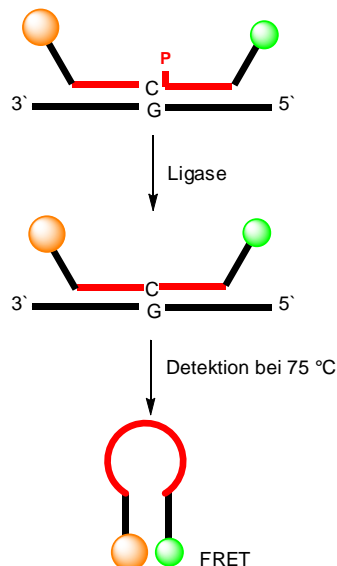


Abbildung 2-42: LDR (*Ligase Detection Reaction*) gekoppelt mit FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

2.5.3 Chemische Ligation^[267] und Chemische Primer Extension^[268, 335]

Mit dieser Nachweismethode ohne Enzyme konnte in der Arbeit von Xu und Kool SNP durch chemischen Ligation nachgewiesen werden. Bei der sog. Phosphorselenoat-Iodid-DNA wurde die Autoligationsreaktion simuliert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Autoligation übertrifft die der Geschwindigkeit der T4 DNA-Ligase. Die Autoligation findet zwischen 3'-Phosphorselenoats und 5'-Iodthymidin statt. Am Kontrollstrang (*Complementary Templating Strand*) befindet sich ebenso eine SNP-Stelle und diese dient gleichzeitig als Matrize für die Bindung von zwei modifizierten Oligonukleotiden. Aufgrund der chemischen Reaktion (Phosphorselenoat-Verknüpfung) bei der Hybridisierung der Oligonukleotiden mit der richtig gepaarten Sequenz, kommt die chemische Ligation zustande. Die Stelle zeigte jedoch keine Umsetzung. Der Nachweis der chemischen Ligation wird durch die Gelelektrophorese geführt.

Eine weitere Möglichkeit der SNP-Detektion wäre die chemische Primer-Extension. Der Ansatz ist vergleichbar mit der enzymatischen Methode, bei der allerdings die HATU und HOAt aktivierten Nukleotide verwendet werden. Obwohl dieser Ansatz noch in den Kinderschuhen steckt, könnte er sich bald zu einer Hochdurchsatzmethode entwickeln.

2.5.4 DETEQ-Konzept

Die Detektion von Basenfehlpaarungen bzw. SNP-Stellen (*Single Nucleotide Polymorphism*) kann auch mit der Fluoreszenzlöschung verfolgt werden.^[22] Diese kann mit verschiedenen Ansätzen erreicht werden. In unserer Arbeitsgruppe werden für die SNP-Detektion redoxaktive Donor-Akzeptor-Systeme entwickelt. Mit diesem Ansatz, auch DETEQ-Konzept (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) genannt, soll auf Basis des Ladungstransfers im komplementären Strang SNP-Stellen fluorometrisch detektiert werden.^[22, 269, 270] Bei der Hybridisierung mit einem fehlgepaarten Gegenstrang soll die Fluoreszenz im fehlgepaarten Duplex im Vergleich zum richtig gepaartem Duplex gelöscht sein. Als Maß für die Fluoreszenzlöschung wird der F_q -Wert nach der Gleichung 2-12 berechnet:

$$F_q = 1 - \frac{F_{\text{int}}}{F_{\text{int}}^0} \quad (\text{Gleichung 2-12})$$

mit: F_q Fluoreszenzlöschung (in %)

F_{int} integrierte Fluoreszenz des fehlgepaarten Duplex

F_{int}^0 integrierte Fluoreszenz des korrekt gepaarten Referenzduplex

So wurden bis jetzt mehrere Donor-Akzeptor-Systeme synthetisiert und bei Basenfehlpaarungen auf Fluoreszenzlöschung getestet. Am effektivstem ist bis jetzt, das sog. Ethidium-Deazaguanin-System, das auf einem oxidativen Lochtransfer beruht. Mit diesem Assay wird eine Basenfehlpaarung über zwei Basenpaare detektiert. Dabei wird die Fluoreszenz bis zu 90 % gelöscht. Da dieser Assay nach dem Supermechanismus abläuft, ist eine Detektion der Basenfehlpaarung im ganzen Codon bisher nicht möglich (s. Abbildung 2-43).^[25]

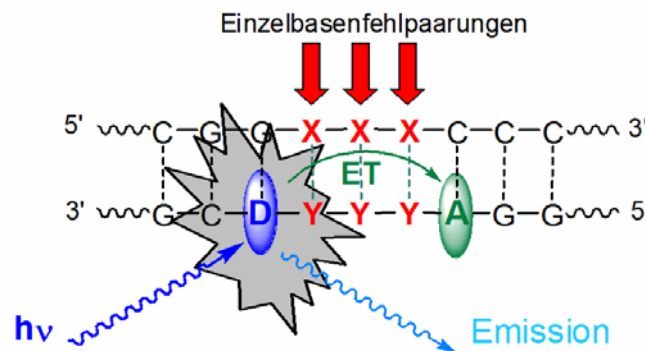


Abbildung 2-43: DETEQ-Konzept nach Wagenknecht *et al.*.

Die Detektion der Basenfehlpaarung der Fluoreszenzlöschung wird auch von anderen Arbeitsgruppen mit verschiedenen Ansätzen verfolgt. So wird bei Seitz *et al.* eine Basenfehlpaarung mit FIT-PNA (*Forced Intercalation-Peptide Nucleic Acid*) verfolgt. Diese PNA ist mit Thiazolorange-Chromophor (TO) als Fluoreszenzsonde modifiziert und kann als DNA-PNA Hybridisierungsassay betrachtet werden. Bei der Hybridisierung mit der komplementären DNA interkaliert dieses Chromophor in die DNA und fluoresziert. Im Falle einer Basenfehlpaarung der DNA in direkter Nähe zum TO kommt es aufgrund erhöhter der konformationellen Flexibilität zur Fluoreszenzlöschung.^[271]

Die Detektion von SNP-Stellen bei Kurane *et al.* beruht auf dem photoinduzierten Elektronentransfer zwischen Chromophor als Ladungsdonor und der zu untersuchenden Base im Gegenstrang als Ladungsakzeptor. Als Chromophore werden wie 5-FAM, BODIPY ML oder TAMRA verwendet, die mit dem 5'-Ende der Oligonukleotide kovalent verknüpft sind. Eine weitere Eigenschaft dieser Chromophore ist, dass sie definierte Redoxpotentiale besitzen und somit nur bestimmte DNA-Basen reduzieren können. Anschließend werden die untersuchenden Oligonukleotide mit modifizierten Oligonukleotiden hybridisiert und mit dem Fluoreszenzspektrometer ausgewertet.^[272]

In dieser Arbeit werden zwei Ansätze verfolgt. Die Detektion von SNP-Stellen mit einem Donor-Akzeptor-System entsprechend dem DETEQ-Konzept aus Ethidium und einem β -indolmodifizierten Nukleosid in Kapitel 3.2 und mit einem DNA-Multichromophorstapel in Kapitel 5.

2.6 M-DNA

Die ersten Untersuchungen an metallionenhaltiger DNA (M-DNA) wurden bereits durchgeführt bevor die Sekundärstruktur der DNA bekannt war.^[273] Die ersten Strukturen der M-DNA wurden 1963 von *Katz et al.* vorgestellt. Er schlug nach der Zugabe von Quecksilbersalzen zur natürlichen DNA sog. Thymin-Hg-Thymin-Basenpaare vor. Diese Struktur konnte später anhand von Kopplungskonstanten in NMR-Untersuchungen belegt werden.^[274] Seitdem wurden mit der M-DNA verschiedene Ansätze verfolgt. Z. B. wird versucht, Elektronen-^[275] oder Energietransfer^[106] durch DNA zu verbessern oder die Herstellung der synthetischen Endonukleasen zu optimieren.^[317] Mit der M-DNA versucht man vor allem die typischen Metalleigenschaften, wie die Leitfähigkeit oder thermische Stabilität, auf die DNA zu übertragen. Diese physikalischen Eigenschaften spielen bei der Darstellung eines molekularen Drahtes oder molekularer Maschinen eine wichtige Rolle für die Zukunft.

Unter M-DNA versteht man heute meistens Basenpaare, bei denen die Wasserstoffbrücken der *Watson-Crick*-Paarung durch Metallionen-Liganden-Wechselwirkungen ersetzt werden. Als Liganden sowohl können natürliche DNA-Basen als auch speziell entwickelte Ligand-Nukleoside geeignet sein und werden derart in die Oligonukleotide eingebaut, dass sie nach Zugabe von Metallionen metallionenhaltige Basenpaare bilden. Durch die Modifizierung der Liganden will man die Metallionen selektiv und zielgenau in die DNA koordinieren. Als „Metalllieferanten“ werden Metallionen oder Metallkomplexe verwendet, die kovalent an die Oligonukleotide gebunden oder interkaliert werden. Die Position von Metallionen kann sowohl außerhalb (Metallkomplexe) als auch innerhalb (Metallionen) der DNA-Helix platziert werden (s. Abbildung 2-44). Die Sekundärstruktur soll möglichst beibehalten werden. Deswegen eignen sich nur Liganden die eine ähnlich Struktur haben, wie die kanonischen Watson-Crick-Basenpaare. Deshalb sind prinzipiell nur drei Koordinationsgeometrien möglich: quadratisch-planar, D_2^d und tetraedrisch Koordination.

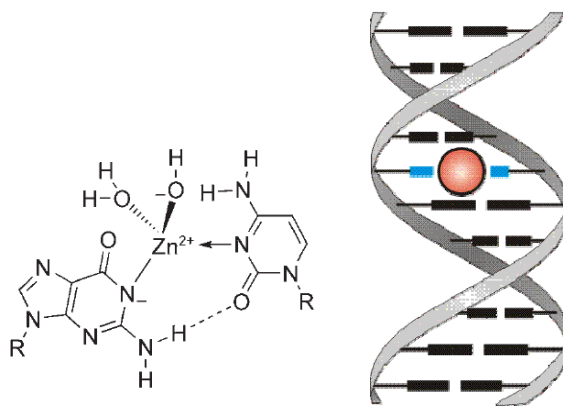


Abbildung 2-44: Darstellung eines metallionenhaltigen Basenpaares mit Zinkkomplex, der in großer Furche liegt (*links*); Metallion im Inneren der DNA-Duplex (*rechts*).

Die M-DNA kann in zwei Gruppen unterteilt werden. In die metallionenkomplexierende DNA und die metallionenhaltige Basenpaar-DNA. Bei der metallkomplexierenden DNA werden zur unmodifizierten DNA Metallionen oder Metallkomplexe dazu gegeben. Während Quecksilberionen^[274] im Inneren der DNA-Helix koordiniert werden, ordnen sich Zinkionen^[276] außerhalb der Helix an (s. Abbildung 2-44). Die Vorteile der metallkomplexierenden DNA sind die schnelle und kostengünstige Durchführung. Nachteil dieser Methode ist, dass die genaue Position des Metallions bzw. -komplexes nicht bekannt ist. Trotzdem reicht die Anwendung von metallkomplexierender DNA von den schnellen Vorversuchen auf Leitfähigkeit^[277] bis zur etablierten Krebstherapie mit Platinkomplexen.^[278]

Die ersten Beispiele der metallionenhaltigen Basenpaare wurden von *Tanaka et al.* und *Shionoya et al.* vorgestellt. Sie synthetisierten *ortho*-Phenylendiamin-Palladiumkomplexe und dessen Derivate (s. Abbildung 2-45).^[279-282]

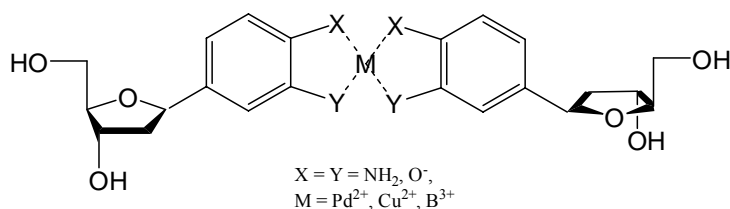


Abbildung 2-45: Aufbau eines metallionenhaltigen Basenpaares nach *Shionoya*. Als künstliche Ligand-Nukleosid wurde Phenylendiamin verwendet. Das Basenpaar ist fähig, zwei- und dreiwertige Metallionen zu binden.

Die ersten Einbauten in die DNA wurden aber erst im Jahr 2000 von *Schultz et al.* berichtet.^[283] Sie synthetisierten ein asymmetrisches metallionenhaltiges Basenpaar. Dieses bestand aus einer Kombination von planaren dreizähligen Liganden Pyridin-2,6-dicarboxylat (Dipic) und einem

Pyridin Nukleosid. Die Zugabe von Cu^{2+} resultierte in einer signifikanten Duplexstabilisierung. Diese Duplexstabilisierung konnte in späteren Arbeiten durch die Modifizierung der Liganden noch weiter erhöht werden (s. Abbildung 2-46).

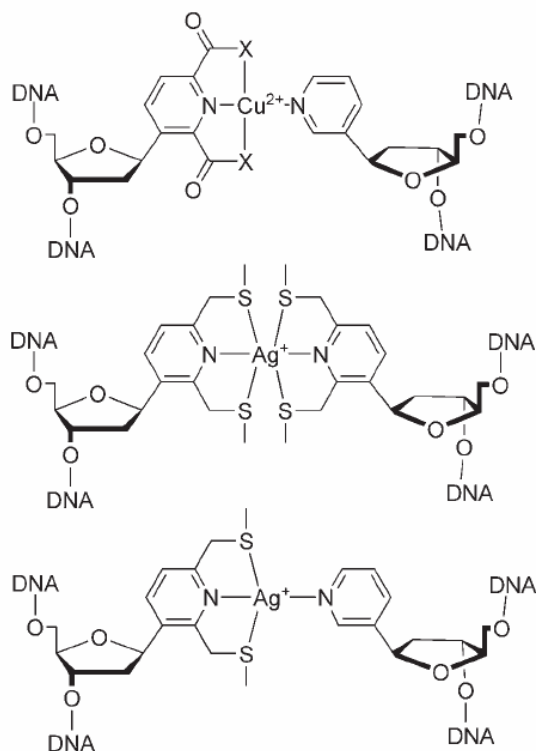


Abbildung 2-46: Metallionenhaltige Basenpaare von *Schultz et al.* sind aus Kombination von Pyridin-2,6-dicarboxylat und Pyridin-Nukleosiden.

So synthetisierten *Shionoya et al.* gleich mehrere künstliche Liganden, die spezifisch eingesetzt werden können (s. Abbildung 2-47).^[284] So sollen Pyridin-Nukleoside bei der Bildung von DNA-Duplexen oder –Triplexen Ag(I) koordinieren können. Metallionenhaltige Basenpaare können auch mehrmals in die Oligonukleotide eingebaut werden, was mit den Hydroxypyridon-Basenpaaren erfolgreich durchgeführt wurde. Fünf benachbarte Liganden-Nukleoside wurden in den Doppelstrang so eingebaut, dass sie in der Lage waren fünf Cu^{2+} Ionen zu komplexieren. Die ESR-Spektren konnten die Metallionwechselwirkung bestätigen. Solche gestapelten Metallionen-Liganden-Systeme sollen Leitfähigkeitseigenschaften erzeugen. Mit Schwefel-substituierten Derivaten der Hydroxypyridon-Basenpaaren will man selektiv weiche Metalle wie Gold oder Platin koordinieren.

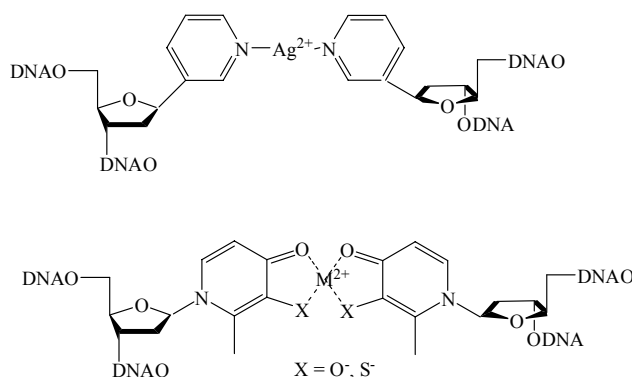


Abbildung 2-47: Darstellung der metallionenhaltigen Basenpaare. Als Liganden wurden Pyridin-Nukleotide, Hydroxypyridone und deren Schwefel-Derivate verwendet.

2,2-Bipyridin wurde als weiterer künstlicher Ligand von *Tor et al.* synthetisiert.^[285] Dieser Ligand befähigt zwar eine günstige quadratisch-planare Koordinationsgeometrie, trägt aber aufgrund seiner Größe eher zur Strukturdestabilisierung der DNA bei. Dieses Ergebnis konnte auch *Achim et al.* in PNA mit in 5-Methyl-2,2-bipyridinen als Ligand bestätigen.^[286] Trotz Zugabe von Ni^{2+} war das Schmelzverhalten zum natürlichen PNA-Duplexe um knapp 10 °C niedriger.

Bei sterisch günstigen Liganden konnte eine konstant erhöhte Duplexstabilität beobachtet werden. Diese physikalische Eigenschaft ist für die Nanomaterialien von großer Bedeutung. So wurde weiter an Liganden geforscht, die die Duplexstabilisierung erhöhen. Diese konnte durch den Metallionen-Salen-Basenpaar erreicht werden.^[287-289] Dieses neue Konzept basiert auf den *N,N'*-Bis(salicyliden)-ethendiamin-Liganden, trivial auch Salen genannt, die gleich mehrere Vorteile bringen. Das Metallionen-Salen-Basenpaar besitzt eine günstige quadratisch-planare Geometrie und ein Ethylendiamin verbrückt zusätzlich die beiden Oligonukleotide der Duplexe. Das Metallionen-Salen-Basenpaar wird erst nach der Duplexhybridisierung synthetisiert. Als Vorstufen werden Salicylaldehyde verwendet, die erst nach Zugabe von Ethylendiamin und Cu^{2+} zu Metallionen-Salen-Basenpaaren werden. Diese besitzen z. Zt. die höchste Schmelztemperatur einer M-DNA (s. Abbildung 2-48).

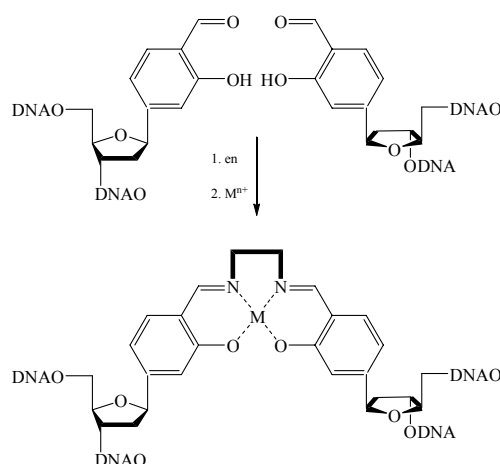


Abbildung 2-48: Die Darstellung eines Metallionen-Salen-Basenpaares. Diese erzeugen z.Zt. im Bereich der M-DNA die größte Duplexstabilisierung.

Durch die Ausnutzung dieser Duplexstabilität ist es möglich, aus zehn aufeinander folgenden Metallionen-Salen-Basenpaaren einen Stapel aus zehn Cu^{2+} Ionen zu erzeugen,^[290] der einer vollständigen Windung der DNA-Helix entspricht. In Kombination mit einer Thymin-Thymin-Fehlpaarung und Hg(II) ist es sogar möglich, einen gemischten Stapel mit programmierbarer Abfolge zweier verschiedener Metallionen in einem Oligonukleotid zu erzeugen.^[291]

2.7 DNA-basierte Multichromophorstapel

Die ein- oder zweifach modifizierte DNA wird bereits routinemäßig in der molekularen Diagnostik erfolgreich eingesetzt.^[292-293] Darüber hinaus bietet die selbstassoziierte und regelmäßige Struktur der Duplex-DNA ein geeignetes Strukturgerüst für photophysikalische Wechselwirkungen von mehr als zwei Fluorophoren, die als nukleosidischer Basenersatz in DNA eingebaut wurden.^[294-301] Durch den Mehrfacheinbau von organischen Fluorophoren in die DNA erhofft neuartige DNA-Systeme zu entwickeln. Man versucht damit,

- die optischen Eigenschaften zu verbessern^[302]
- eine Basenfehlpaarung im Gegenstrang nachzuweisen^[303]
- ein Templat für die Nanotechnologie zu entwickeln^[304]

Mit der entsprechenden Modifikation von DNA-Basen lassen sich die Chromophore auf zwei verschiedene Arten in die DNA plazieren. Sie können sich sowohl in der DNA-Helix als auch außerhalb befinden, dabei soll nach der Modifizierung die DNA-Struktur möglichst intakt bleiben (s. Abbildung 2-49). Ziele solcher Forschungen sind Anwendungen in der DNA-Analytik, um z. B. SNP-Stellen selektiv zu detektieren oder auch elektronische Bauteile aus Makromolekülen in der

Nanotechnologie zu entwickeln.

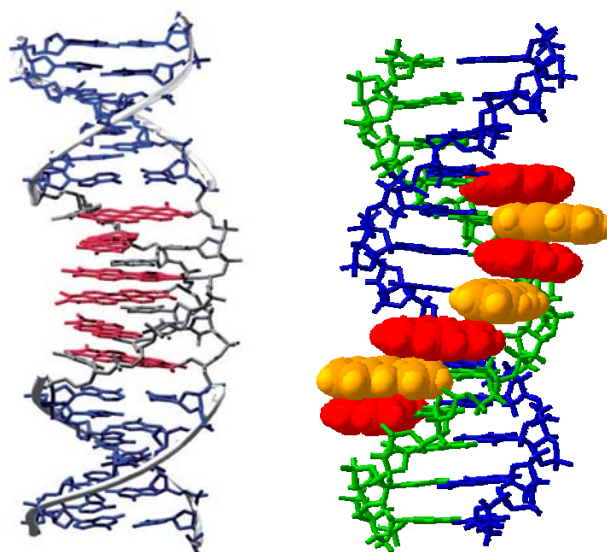


Abbildung 2-49: DNA-basierte Multichromophorstapel. Die Chromophore können sich, sowohl in der DNA-Helix, als auch außerhalb der DNA-Helix befinden.

Für potenzielle Anwendungen in der DNA-Analytik ist das Ziel die Verstärkung und Modulation der Fluoreszenzeigenschaften, wenn mehrere benachbarte Fluorophore in die DNA eingebaut werden.^[294] Am wichtigsten ist dabei, dass die Basenpaareigenschaften solcher modifizierten Oligonukleotide (ON) erhalten bleiben, wenn sie als Sonden in der molekularen Diagnostik mit DNA eingesetzt werden sollen, z. B. zum Nachweis von SNP (s. Abbildung 2-49). Ein wichtiges Verfahren in diesem Zusammenhang ist die kovalente Verknüpfung von Chromophoren mit natürlichen DNA-Basen. Letztendlich ist das Ziel eine Methode für den Hochdurchsatz zu entwickeln wie z. B. die DNA-*Microarrays*.

Auf der Basis der supramolekularen Eigenschaften der DNA, wird von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, DNA-Chromophor-Hybride zu entwickeln (s. Abbildung 2-50).^[313, 314]

Kool et al. synthetisierten DNA-Hybridverbindungen nach kombinatorischem Ansatz. Mit diesem Ansatz soll das Emissionsmaximum oder die Quantenausbeute optimiert werden. Der Grundgedanke ist auf der Basis von Farbbänderung neue Biosensoren für die Detektion und Identifikation genetischen Materials in Wasser zu entwickeln^[294].

Neben den Superfluorophoren für die Biosensorik wird mit Multichromophorstapeln versucht, Nanodrähte zu synthetisieren. Dabei dient DNA-Strang nicht nur als Rückgrat, sondern ist auch

wichtig für die geordnete Struktur des Nanodrahtes. Das kann nicht nur durch die Selbstorganisation der DNA-Basen erreicht werden, sondern auch durch die Modifikation der DNA selbst. Z. B. mit Hilfe der sogenannten LNA (*Locked Nucleic Acid*). Die Untersuchungen von Wengel *et al* zeigten, daß mit LNA die Hybridisierungsaffinität deutlich gesteigert wird im Vergleich zu normaler DNA und eine höhere thermische Stabilität aufweisen^[295].

Yamana *et al.* stellten beim Mehrfacheinbau von 1-Pyrenethyl in RNA einen helikalen Pyrenethylstapel dar, der ab vier Pyrenethyl-Einheiten zu starker Excimerfluoreszenz führte. Das Pyrenethyl wurde an der 2'-OH der Ribose kovalent verknüpft.^[299]

Asanuma *et al.* verwendeten einen Methyl Red H^{*}-Chromophor, der nach dem Mehrfacheinbau im Einzelstrang eine geordnete helikale Aggregation aufwies. Diese Aggregationsanordnung konnte bei anschließender Hybridisierung mit verschiedenen Gegensträngen moduliert werden.^[300]

Häner *et al.* stellten sog. Oligopyrene dar, die entweder als Verknüpfungs-Basensurrogate zwischen zwei DNA-Enden dienen oder als künstliche doppelsträngige Helices eingesetzt werden können.^[301]

Leumann *et al.* untersuchten und optimierten mit Biphenyl C-Nukleosiden die thermische Stabilität der Duplexe. Diese Stabilität wird durch die Änderung der Biphenylensubstituenten, die als Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren fungieren, gesteuert.^[297]

In unserer Arbeitsgruppe wird versucht, Pyren-,^[303, 316] 10-Methylphenothiazin-,^[302, 316] Pyrenylethynyl-,^[304] Perylenbisimid-modifizierte^[315] DNA-Basen oder Basensurrogate mehrfach in die DNA einzubauen.

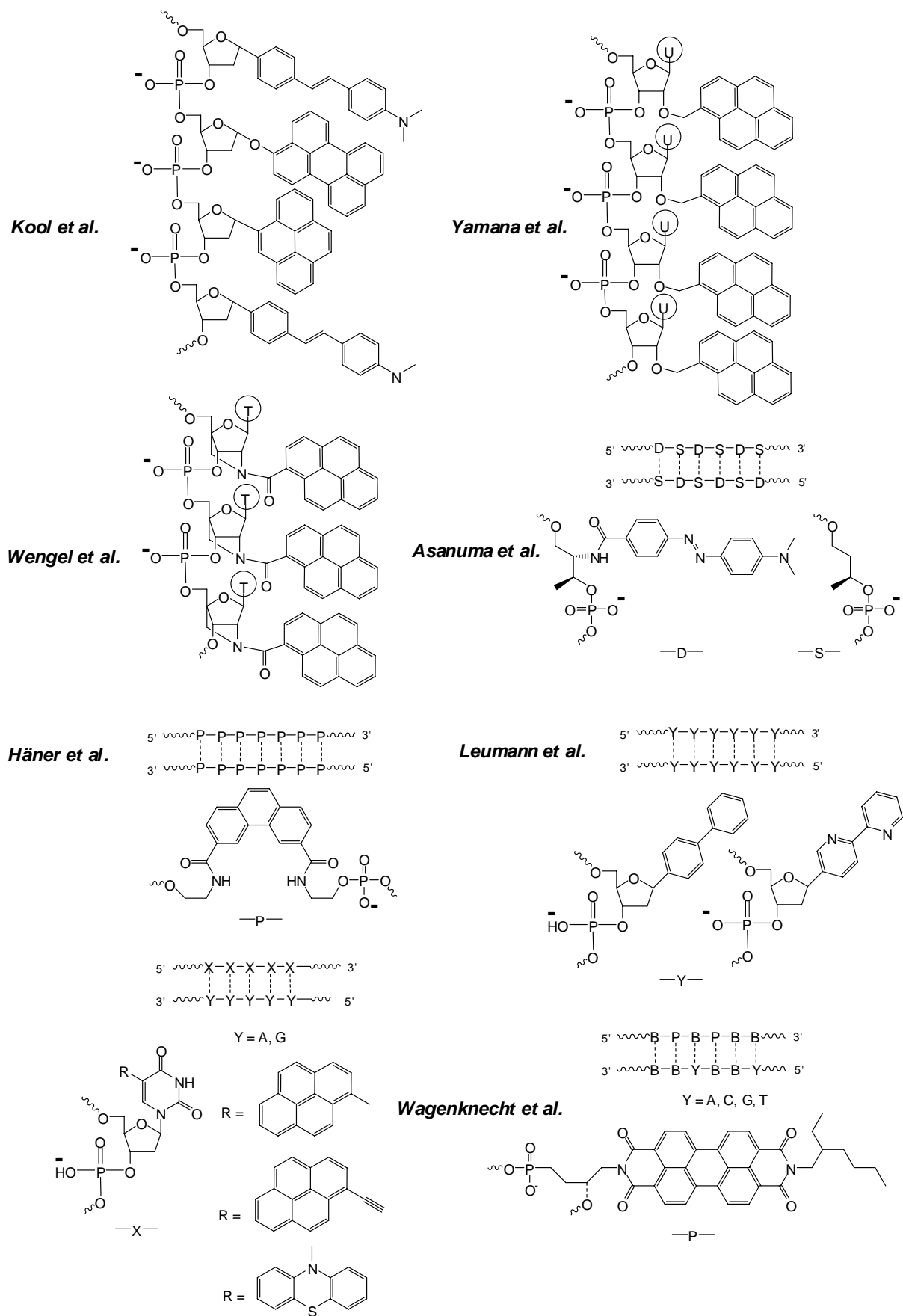


Abbildung 2-50 : Übersicht der dargestellten Multichromophore.

Beim fünffachen Einbau der Py-dU-Chromophore nebeneinander konnte eine helikale Anordnung der Pyrenreste beobachtet werden, die starke excitonische Wechselwirkung ermöglicht. Dies führte zur Verstärkung der Fluoreszenz, somit kann von einem Multichromophor gesprochen werden. Diese Pyrenstapel Struktur zeigte eine große Abhängigkeit gegen über Strukturänderungen, denn bei der Einführung der Basenfehlpaarungen konnten deutliche Änderungen in der optischen Spektroskopie festgestellt werden. Somit eignet sich dieser Multichromophor als duplexsensitive Fluoreszenzsonde (s. Abbildung 2-51).^[303]

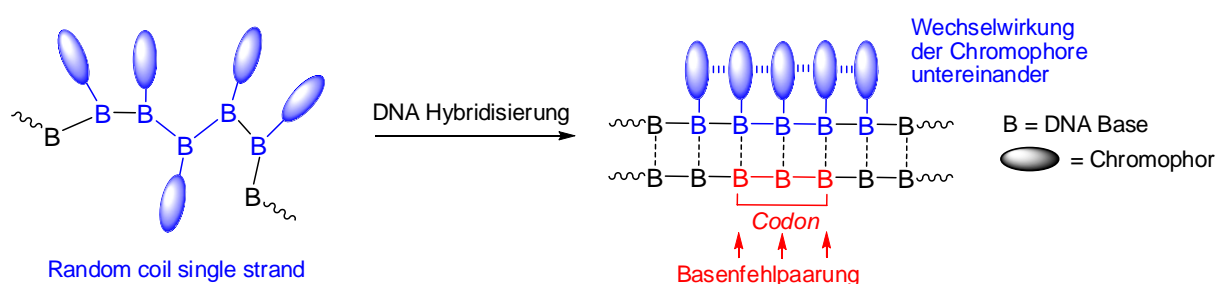


Abbildung 2-51: Darstellung eines Multichromophorstapels. Ziel solcher neuer Fluoreszenzsonden ist u.a. die Detektion der Basenfehlpaarungen in einem ganzen *Codon*.

Beim fünffachen Einbau der Pz-dU-Chromophore nebeneinander konnte eine ähnliche Chromophoranordnung wie bei den Pyren-Chromophoren beobachtet werden, die nach der Dissoziation des Duplexes verloren geht. Durch die Kombination von fünf direkt benachbarten Phenothiazineinheiten entstand ein ausgedehnter delokalisierte Chromophor mit neuartigen Fluoreszenzeigenschaften, die stark von den Eigenschaften des Monomers abweichen.

Beim doppeltem Einbau der Pyrenylethynyl-Uridine^[304] führt die hydrophobe π -Wechselwirkung der Pyren-Chromophore untereinander zu einer elektronischen Wechselwirkung die zur Verstärkung und Modulierung der Fluoreszenzeigenschaften führt.^[322] Dieser Ansatz ist vielversprechend für die Anwendungsmöglichkeit in der supramolekularen Chemie.

Beim konjugierten Doppeleinbau von Perylenbisimid im Abstand einer Base ist es möglich, im Gegenstrang eine direkt gegenüberliegende Basenfehlpaarung, durch die Excimerfluoreszenz nachzuweisen. Mit den pyrenmodifizierten Oligonukleotiden und durch die Fluoreszenzspektroskopie ist es möglich, nicht nur einzelne Basenfehlpaarungen, sondern ganze Codons nachzuweisen.^[315]

3. Ladungstransfer in Oligonukleotiden

3.1 Indolmodifizierte Oligonukleotide

3.1.1 Hintergrund

Wie in Kapitel 2.4 dargestellt kann Indol sowohl in kurzen DNA-Bindungspeptiden als auch in modifizierten DNA-Bindungsproteinen ^[160b, 291] als potenzieller Lochakzeptor fungieren.^[293] Durch Oxidation entsteht ein acides Indolradikalkation ($pK_s \sim 4$), das danach spontan deprotoniert zu einem neutralen Indolradikal. Dieser Prozess wird auch als PCET (*Proton-Coupled Electron Transfer*) bezeichnet.^[321]

Basierend auf diesen Erkenntnissen sind für die Untersuchung des oxidativen Ladungstrfers in DNA die indolverknüpften natürlichen β -Nukleoside als Lochakzeptor vom großen Interesse (s. Abbildung 3-1).^[325-331]

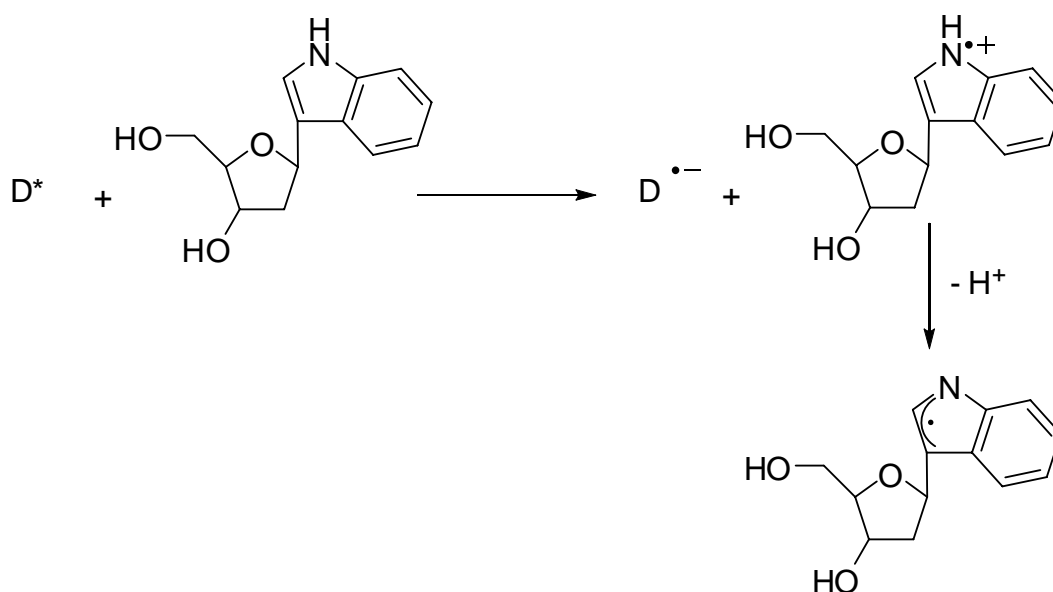


Abbildung 3-1: Mechanismus zur Bildung eines stabilen Indolradikals (**1B**).

Über die Darstellung von indolmodifizierten Nukleosiden und dessen Einbau in die DNA wurde mehrmals berichtet.^[299, 306-309] Prinzipiell können Indole mit der 2'-Desoxyribose über drei Positionen N-1, C-2 und C-3 verknüpft werden. Um aber die Möglichkeit eines PCETs beizubehalten eignen sich die C-3 des Indols am besten zur Verknüpfung. Dabei entsteht ein sog. C-Nukleosid das, im Vergleich zum Glycosylamin, gegen Hydrolyse stabil ist.

Deshalb soll in dieser Arbeit ein über C-3 verknüpftes Indol als β -Nukleosid (In) synthetisiert werden, spektroskopisch untersucht und in die DNA (In-DNA) eingebaut werden.^[330, 332, 333]

Zum Schluss sollen die Ergebnisse der In-DNA mit strukturell unterschiedlich, bekannten indolmodifizierten DNA verglichen werden. Die Basensurrogate dieser indolmodifizierten DNA sind (S)-1-[Bis(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-3-[2-(indol-3-yl)-ethylamino]-propan-2-ol als azyklisches, nicht natürliches Nukleosidanalogon (In')^[28, 324] und

2-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol, ein über C-2 verknüpftes Indol als β -Nukleosid (In'') (s. Abbildung 3-2).^[325-327]

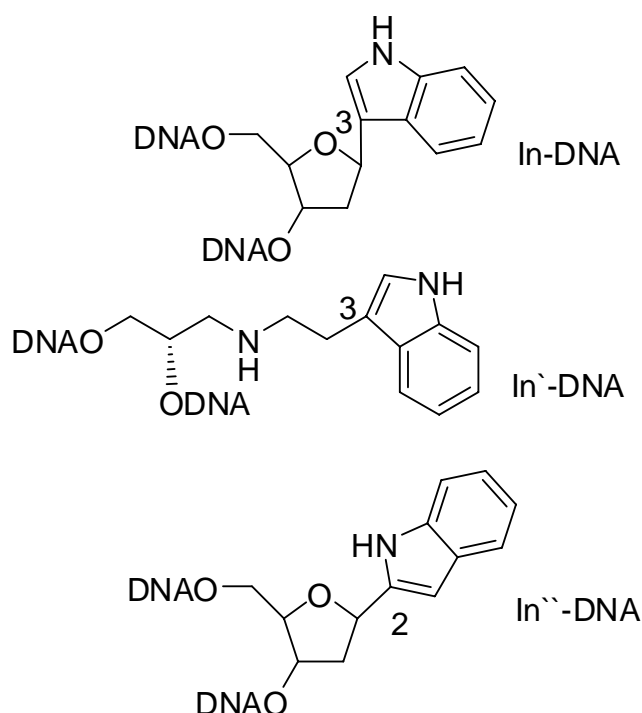


Abbildung 3-2: C-2 und C-3 verknüpfte Indol-Nukleoside und azyklisches nicht-nukleosidisches Indol-Basensurrogat als Lochakzeptoren.

3.1.2 Synthese des indolmodifizierten β -Nukleosids **1b** und des entsprechenden Phosphoramidits **3**

Für das Indol-Nukleosid **1b** wurde aus 1-O-Methyl-3,5-di-O-para-toluoyl-2-desoxyribose (**4**)^[303, 304] und 1-Phenylsulfonylindol (**5**) über eine elektrophile aromatische Substitution in mäßigen Ausbeuten (35%) **6a/ 6b** hergestellt (s. Abbildung 3-3).^[294-296]

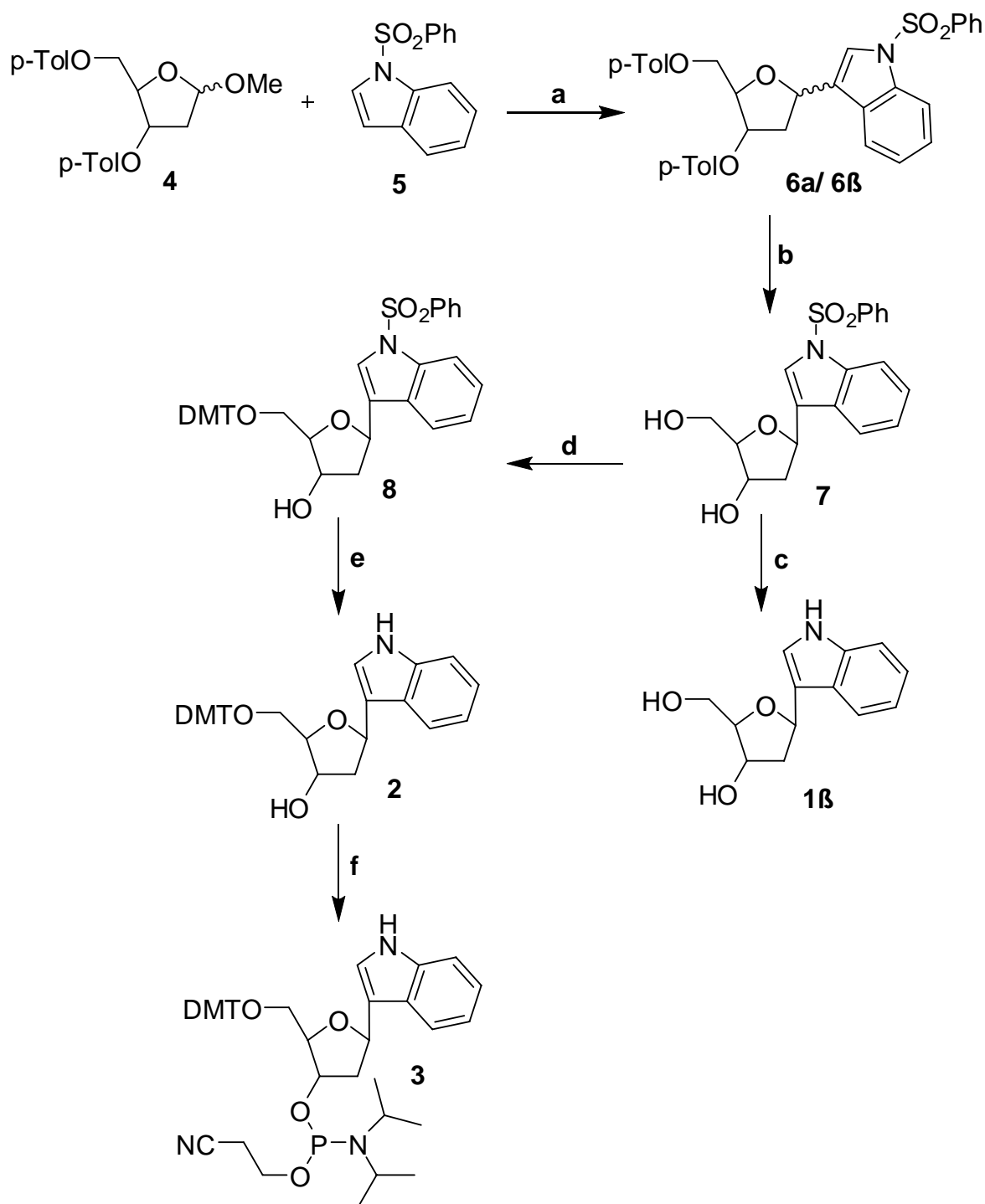


Abbildung 3-3: Synthesestrategie für die Darstellung eines Indol-Phosphoramidits **3**; a) BF₃•OEt₂ (6.9 eq), CH₂Cl₂, -15 °C, 1.5 h, 9 % **6a**, 26 % **6b**; b) NaOMe (3 eq), MeOH, 6 h, RT, 83 %; c) 18-Krone-6 (1.5 eq), KOH (33 eq), MeOH, 1,4-Dioxan, 2 h, RT, 15 %; d) DMT-Cl (1.3 eq), NEt₃ (3 eq), Pyridin, RT, 16 h, 69 %; e) 18-Krone-6 (1.5 eq), KOH (33 eq), MeOH, 1,4-Dioxan, RT, 16 h, 80 %; f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.5 eq), NEt₃ (3 eq), CH₂Cl₂, RT, 45 min, 95 %.

Für die Aktivierung des Glycosyldonors **4** wurde die milde Lewis-Säure Bortrifluorid verwendet. Die Reaktion wurde bei -15°C, durchgeführt, weil dadurch die Stereoselektivität gesteuert werden kann. Bei sehr niedrigen Temperaturen (-78 °C) wird die Bildung des kinetischen Produkts **6a**

bevorzugt und bei etwas höheren Temperaturen (-15 °C) das thermodynamische Produkt **6β**. Das Anomerengemisch konnte durch Säulenchromatographie bzw. präparative HPLC getrennt werden. Die Trennung ergab 26 % des β-Anomers **6β** und 9 % des α-Anomers **6α**. Die anschließende Charakterisierung durch ESI-HRMS, 2D-NMR Spektroskopie (COSY und HSQC und NOESY-Messungen) bestätigte die Struktur und Konformation der beiden Verbindungen **6β** und **6α**. Die Multiplizität von H1' von **6β** zeigt bei 5.43 ppm ein doppeltes Dublett ($J = 10.4$ Hz, 5.2 Hz).^[320] Die NOESY-Messungen von **6β** zeigen einen Kreuzpeak zwischen H1' und H2'α.

Außer dem Anomerengemisch **6α/ 6β**, konnte die offenkettige Bis-Indolribofuranose **9** als Nebenprodukt isoliert werden (10%) (s. Abbildung 3-4).

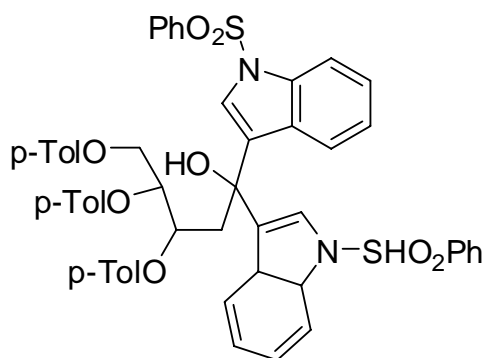


Abbildung 3-4: Isoliertes Nebenprodukt. Offenkettige Bis-Indolribofuranose **9**.

Für die nachfolgenden Reaktionen wurde nur das β-Isomer **6β** weiter umgesetzt. Die anschließende Entschützung von **6β** am 3'- und 5'-Ende der 2'-Desoxyribose wurde nach der Methode von Zemplén durchgeführt.^[303] **7** konnte nach 6 h Reaktionszeit bei RT in sehr guten Ausbeuten (83 %) isoliert werden. Um das Indol-Nukleosid **1β** in DNA einzubauen, musste die Verbindung **7** desulfonyliert und dann trityliert werden. In Synthesevorexperimenten wurde jedoch herausgefunden, dass es günstiger ist, wenn Verbindung **7** zuerst trityliert (**2**, 69%) und anschließend mit 18-Krone-6 und Kaliumhydroxid in Methanol und 1,4-Dioxan desulfonyliert (**8**, 80%) wird. Wenn man dagegen zunächst **1β** desulfonyliert und anschließend zu tritylieren versucht, wurde **2** nur in Spuren erhalten.

Das ungeschützte Indol-Nukleosid **1β** konnte für die spektroskopische Charakterisierung auf zwei verschiedene Wege erhalten werden (s. Abbildung 3-5);

- i) Über die Zemplén-Entschützung von **6β**. Hier konnte die Verbindung **1β** zusammen mit **1α** säulenchromatographisch als Nebenprodukt in geringen Ausbeuten isoliert werden.

- ii) Durch Desulfonylierung von **7** (15 %).

3.1.3 Spektroskopische Untersuchungen des 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indols (**1 β**)

In diesem Kapitel soll die spektroskopische Charakterisierung von 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**1 β**) dargestellt und mit 3-(2'-Desoxy- α -D-ribofuranosyl)-indol (**1 α**) und kommerziell erhältlichem Indol (**14**) verglichen werden.

Die Absorptionmessungen wurden in Methanol (MeOH) und Acetonitril (MeCN) durchgeführt. Alle Verbindungen **1 α** , **1 β** und **14** zeigen in beiden Lösungsmitteln im Bereich zwischen 265 nm < λ < 280 nm eine nahezu identisches Absorptionsverhalten (s. Abbildung 3-5).

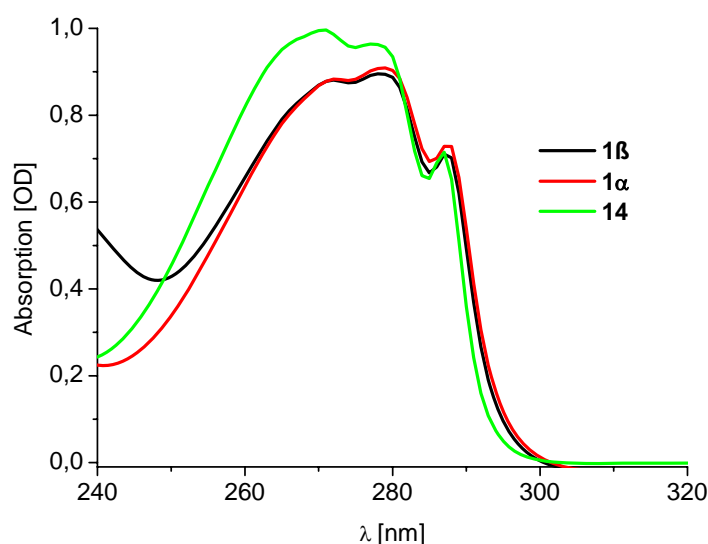


Abbildung 3-5: Absorptionsspektren von **1 α** , **1 β** und **14** in Methanol.

Die stationäre Fluoreszenz wurde bei der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{exc}} = 290$ nm und bei gleicher optische Dichte ($\lambda = 278$ nm) durchgeführt (s. Abbildung 3-9). Alle Spektren zeigen, sowohl in Methanol als auch in Acetonitril (MeOH, MeCN), ähnliche Fluoreszenz. Die Verbindungen **1 α** und **1 β** zeigen im Vergleich zu **14** eine Rotverschiebung der Fluoreszenzmaxima ($\lambda = 310$ nm und 375 nm) um 10 nm (s. Abbildung 3-6).

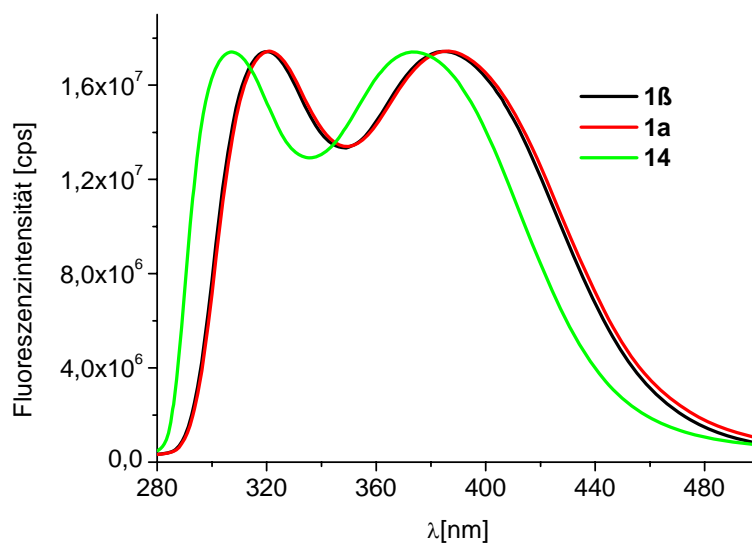


Abbildung 3-6: Fluoreszenzspektren von **1a**, **1b** in MeOH, bei gleicher optische Dichte ($\lambda_{\text{exc}} = 278 \text{ nm}$). Als Vergleich diente das kommerziell erhältliche Indol (**14**).

3.1.4 Darstellung der indolmodifizierten Oligonukleotide

Das Indol-Phosphoramidit **3** wurde in Acetonitril gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Mit Hilfe eines modifizierten Kupplungsprotokolls mit einer Kupplungszeit von 15 min statt 1.5 min ließ sich eine gute Kupplungseffizienz erreichen (s. Abbildung 3-7).

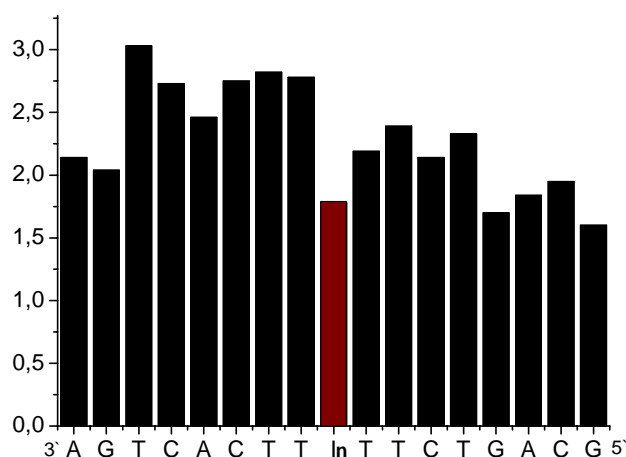


Abbildung 3-7: Tritylmonitor der Oligonukleotidsynthese von **1b** (**In**).

Für die spektroskopische Untersuchung von Indol als artifizieller DNA-Base wurden Sequenzen gewählt, bei denen die direkte Basenumgebung der Modifikationsstelle variiert wurde (s. Abbildung 3-8). Indol wird als isosterer Purinersatz betrachtet. Deswegen so wurde als Gegenbase das Pyrimidin C gewählt.

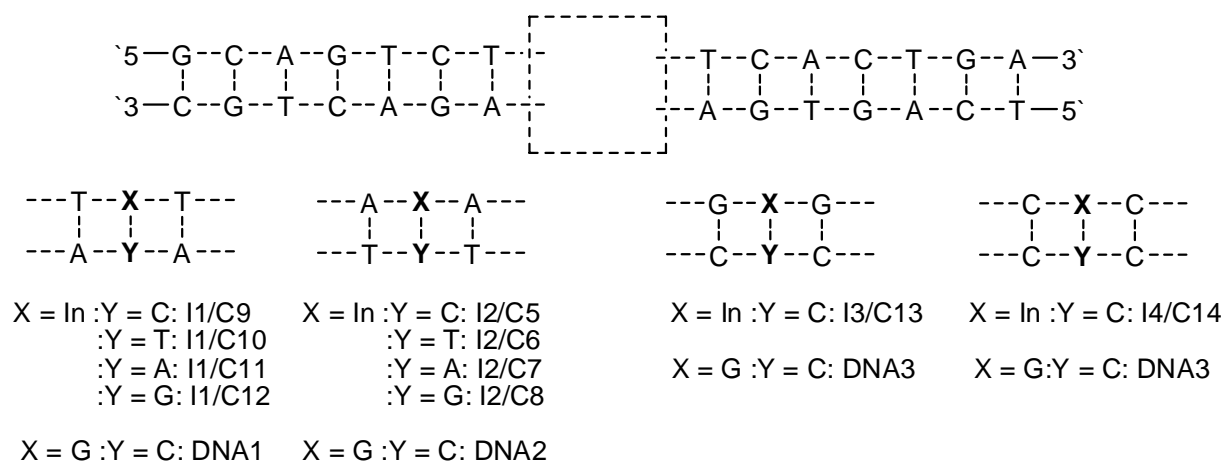


Abbildung 3-8: Sequenzen der indolmodifizierten Oligonukleotide. **In** = Indol-Nukleotid **1b**.

Nach automatisierter Synthese wurden die indolmodifizierten Oligonukleotide nach Standardbedingungen aufgearbeitet. Die Reinigung wurde mittels HPLC durchgeführt.

3.1.5 Spektroskopische Untersuchung der indolmodifizierten DNA

Die Absorptionsspektren der In-DNA (**I1/C9-I/C12**, **I2/C5-I2/C8**, **I3/C13** und **I4/C14**) zeigen im Vergleich zur unmodifizierten DNA (**DNA1-DNA4**) geringere optische Dichte (s. [Abbildung 3-9 links](#)).

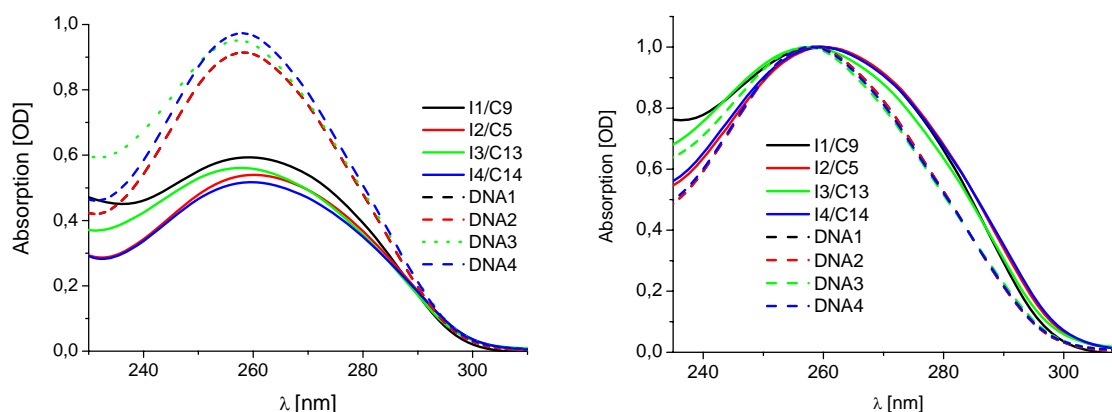


Abbildung 3-9: Absorption von 2.5 μM Duplexen wurde in 10 mM NaPi , bei pH 7 gemessen. *Links* Absorptionsspektren von indolmodifizierten (**I1/C9**, **I2/C5**, **I3/C13** und **I4/C14**) und unmodifizierten DNA (**DNA1-DNA4**). *Rechts:* Normierte Absorptionsspektren.

Diese resultiert sich aus dem geringeren Extinktionskoeffizienten des Indol-Nukleosids **1b** ($\epsilon_{260} = 3.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) im Vergleich zu den natürlichen DNA-Basen. Eine spezifische Absorptionsbande für das indolmodifizierte Nukleosid ist nicht erkennbar. Wurden die optischen Dichten im Bereich zwischen 260 nm und 310 nm normiert (s. [Abbildung 3-9 rechts](#)), so beobachtet man zwischen 280 nm und 290 nm eine „Schulter“ als Verbreiterung der DNA-Absorptionsbande. Diese ist auf die

Anwesenheit von Indol-Nukleosid zurückzuführen.

Bei Schmelztemperaturmessungen der indolmodifizierten Oligonukleotide (**I1/C9-I/C12**, **I2/C5-I2/C8**, **I3/C13** und **I4/C14**) wurde, im Vergleich zum unmodifizierten Duplex, ein deutlich destabilisierender Effekt beobachtet (s. Tabelle 3-1). Die destabilisierende Wirkung der indolmodifizierten Oligonukleotide ist zwar aus der Literatur bekannt,^[299, 306-309] wurde aber bis jetzt kontrovers diskutiert. Die Destabilisierung wurde entweder auf das Linkersystem (In') oder auf die unnatürliche Nukleosid-Konformation (In'') zurückgeführt. Interessanterweise ist dieser destabilisierende Effekt auch bei über C-3 verknüpften β -Indol-Nukleosiden erkennbar.

Tabelle 3-1: Die Schmelztemperatur der indolmodifizierten Duplexe (2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH7) und 250 mM NaCl).

Duplex	T _m [°C]	ΔT_m [°C] ^b
I1/C9	52 (65.3) ^a	-13.3
I1/C10	52.5	-12.8
I1/C11	53	-12.3
I1/C12	51.8	-13.5
I2/C5	51 (66.1) ^a	-15.1
I2/C6	53	-13.1
I2/C7	54	-12.1
I2/C8	54	-12.1
I3/C13	57 (70.9) ^a	-13.9
I4/C14	53.4 (71.7) ^a	-18.3

a = Schmelztemperatur der unmodifizierten DNA (**DNA1-DNA4**); **b** = Differenz aus unmodifizierten und indolmodifizierten Duplexen.

Somit konnte hiermit eindeutig nachgewiesen werden, dass die destabilisierende Wirkung größtenteils durch Indol selbst und nicht durch den Linker verursacht wird. Grund für diese Destabilisierung könnte die *anti*-Konformation des Indol-Nukleosids im Oligonukleotid sein. Bei so einer Konformation würde die NH-Gruppe in die große Furche ragen und somit keine direkte Wasserstoffbrückenbindung mehr ausüben können.

Um den Einfluss des β -Indol-C-Nukleosids **1b** auf die Duplexkonformationen zu analysieren wurden CD-Spektren aufgenommen. Die Spektren zeigen die Charakteristika der B-Konformation. Somit ist die destabilisierende Wirkung des Indol-Nukleosids von lokaler Natur (s. Abbildung 3-10).^[292]

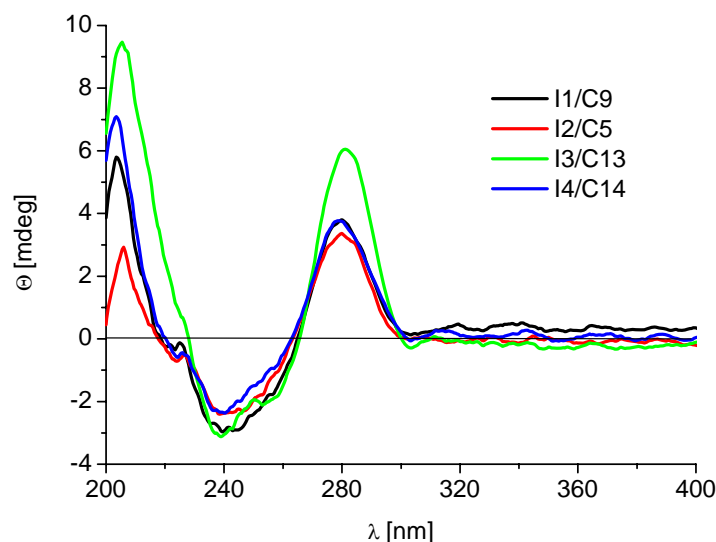


Abbildung 3-10: CD-Spektren von In-DNA. Die Proben enthalten 2.5 μM Duplex in 10 mM NaP_i , pH 7.

Die elektronische Wechselwirkung des Indols als artifizielle Base im Oligonukleotid konnte im Vergleich der normierten Fluoreszenzspektren zwischen indolmodifizierten DNA (**I3/C13**) und Indol-Nukleosid **1B** beobachtet werden (s. Abbildung 3-11). Der Fluoreszenzspektrum zeigt eine deutliche Blauverschiebung (ca. 30 nm) des Fluoreszenzmaximums und ist ein Indiz für die Interkalation des Indolrestes im DNA-Basenstapel.

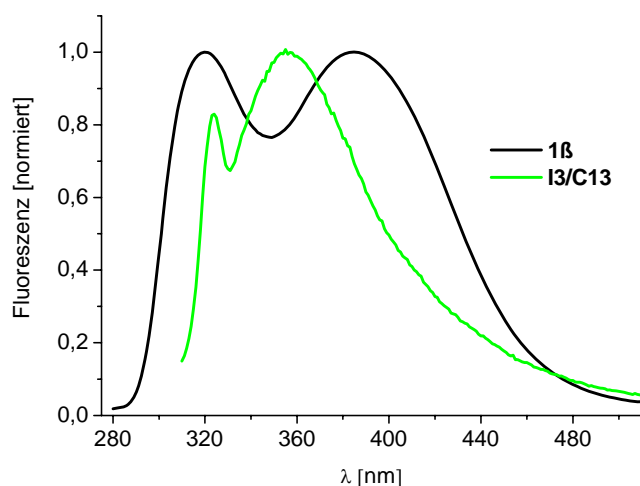


Abbildung 3-11: Die normierten Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 290 \text{ nm}$) von **1B** und **I3/C13**. Die Emission vom **I3/C13** ist um 30 nm blauverschoben. Die Probe von **1B** enthält 0,1 mM in Methanol und die Probe **I3/C13** enthält 2.5 μM Duplex in 10 mM NaP_i , pH 7.

Die Fluoreszenzspektren der indolmodifizierten Oligonukleotiden wurden bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 290 \text{ nm}$ gemessen (s. Abbildung 3-12).

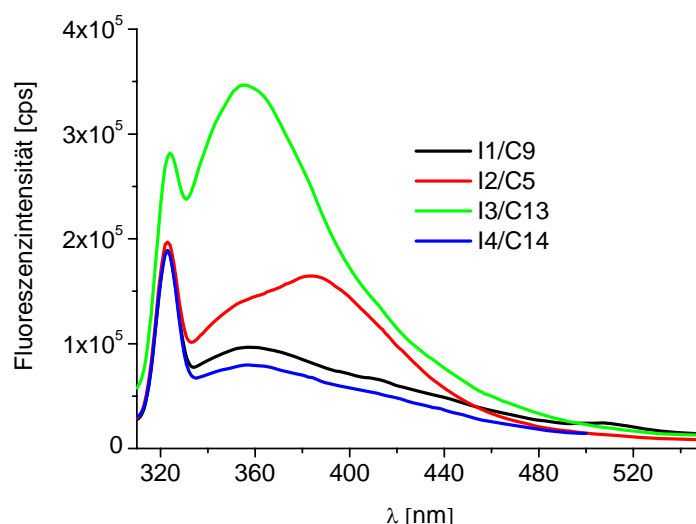


Abbildung 3-12: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) von $2.5 \mu\text{M}$ Duplex in 10 mM NaP_i , pH 7.

Somit lässt sich Indol-Nukleosid **1B** in DNA nicht selektiv anregen, was die Interpretierung der Fluoreszenzspektren erschwert. Die Emission der indolmodifizierten Oligonukleotide (**I1/C9-I1/C12**, **I2/C5-I/C8**, **I3/C13** und **I4/C14**) zeigen Maxima bei $\lambda = 355 \text{ nm}$ und bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ für Duplex **I2/C5**. Die Fluoreszenzmaxima bei $\lambda = 355 \text{ nm}$ deuten auf einen lokal angeregten Zustand des Indols und bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ auf eine Exciplex-Bildung hin. Die Emission der fehlgepaarten Indol-DNA zeigen ähnliche Spektren.

Aufgrund der fehlenden Anregungswellenlänge für **1B** konnten die Quantenausbeuten der indolmodifizierten Oligonukleotide nur indirekt bestimmt werden. Zuerst wurde der sog. Löschquotient zwischen Indol-Nukleosid **7** und indolmodifizierter DNA bestimmt, der zwischen 0.5 % bis 2 % liegt. Um den Fluoreszenzanteil des Indol-Nukleosids **1B** in indolmodifizierter DNA zu bestimmen, wurde der Extinktionskoeffizient von **1B** gegen den Extinktionskoeffizient der jeweiligen Indol-DNA dividiert. Die Quantenausbeute ergibt sich durch die Multiplikation der beiden Quotienten. So liegt die Quantenausbeute der Indol-DNA zwischen 0.0001 bis 0.0004 (s. Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Bestimmung der Quantenausbeuten in indolmodifizierten Duplexen.

Duplex	ϵ_{260} -Quotient [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	Löschquotient [%]	Φ_F (indirekt)
I1/C9	$3.2 / 154.8 = 0.0206$	2	0.0004
I2/C5	$3.2 / 166.7 = 0.0191$	1	0.0002
I3/C13	$3.2 / 160.0 = 0.02$	1.3	0.0003
I4/C14	$3.2 / 148.5 = 0.0215$	0.5	0.0001

ϵ = Extinktionskoeffizient, Φ_F = Quantenausbeute

Diese starke Fluoreszenzlöschung deutet auf einen sehr effizienten Ladungstransfer hin, denn aufgrund der Singulett-Singulett-Energie von **1b** $E_{00} = 4.27 \text{ eV}$ ($\lambda = 290 \text{ nm}$) und des Oxidationspotentials $E_{\text{Ox}}(\text{In}/\text{In}^{*+}) = 1.0 \text{ V}^{[35, 231]}$ ergibt sich nach der Rehm-Weller-Gleichung ein Oxidationspotential des photoangeregten Indols* von -3.27 V und ist somit thermodynamisch fähig, alle natürlichen DNA-Basen zu reduzieren.

3.2 Ethidium- und indolmodifizierte Oligonukleotide als Donor-Akzeptor-System

Im Kapitel 3.1 wurde die Basis gelegt um das indolmodifizierte Nukleosid **1b** für Ladungstransferexperimenten, als Lochakzeptor zu verwenden. So kann **1b** mit einem geeigneten Ladungsdonor ein Donor-Akzeptor-System bilden. Das zentrale Ziel solcher Donor-Akzeptor-Systeme ist die Detektion von Basenfehlpaarungen im Gegenstrang als Abschnitt eines Gens. Ein weiterer Grund für die Verwendung des Indol-Nukleosids **1b** als Lochakzeptor, ist die elektrochemische Ähnlichkeit zu 7-Deazaguanin. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass 7-Deazaguanin ($E_{\text{Ox}}(\text{Z}/\text{Z}^{*+}) = 1.0 \text{ V}^{[36]}$) als Lochakzeptor zusammen mit Ethidium als Ladungsdonor über eine Distanz von zwei Basenpaaren ein Donor-Akzeptor-System bildet, das benutzt werden kann, um Basenfehlpaarung nachzuweisen. Nachteil dieses Systems ist, das 7-Deazaguanin selektiv mit C paart. So eignet sich dieser Donor-Akzeptor-System nur für Sequenzabschnitte, wo C als Gegenbase an entsprechender Stelle vorkommt und dort mit 7-Deazaguanin paaren kann.

Dieser Nachteil sollte mit dem Indol-Nukleosid **1b** gelöst werden, denn **1b** besitzt ein ähnliches Oxidationspotential wie 7-Deazaguanin und kann aufgrund seiner Struktur als isosterischer Purin-Ersatz betrachtet werden. Gravierender Unterschied zu 7-Deazaguanin ist, dass der Indol aufgrund der fehlenden Substituenten keine Wasserstoffbrückenbindung mit anderen Basen ausbilden sollte und somit als universale Base fungiert. Deshalb soll in diesem Kapitel aus Ethidium als Ladungsdonor und Indol als Lochakzeptor ein Donor-Akzeptor-System getestet werden, das sequenzunabhängig auf über eine Distanz von zwei Basenpaaren Basenfehlpaarungen nachweist. Die Detektion soll über die Fluoreszenz erfolgen.

Die Hintergrundinformationen zu den bisherigen Studien zum Ladungstransfer mit Ethidiums als DNA-Basensurrogat wurden im Kapitel 2.1.3 vorgestellt. Zum Schluss soll Donor-Akzeptor-System aus Ethidium und Indol mit verwandten Donor-Akzeptor-Systemen verglichen werden

(s. Abbildung 3-13).

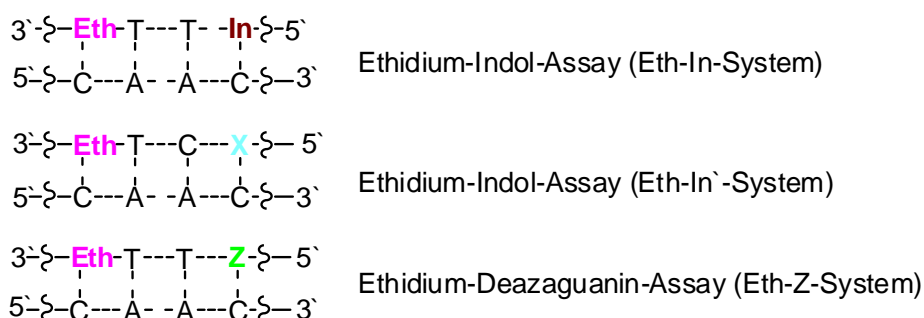


Abbildung 3-13: Donor-Akzeptor-Systeme für die Untersuchung des Lochtransfers mit Ethidium (Eth). **In** = Indol-Nukleosid (**1b**), **X** = azyklischer nicht-nukleosidisches Indol-Basensurrogat (In'), **Z** = Deazaguanin.

3.2.1 Synthese des Ethidium-Phosphoramidits **22**

In verschiedenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Synthese des Ethidium-Phosphoramidits **22**, das über eine der exocyclischen Aminofunktionen glycosidisch mit der 2'-Desoxyribose-Einheit verknüpft ist, nicht in zufriedenstellenden Ausbeuten zu realisieren ist (s. Abbildung 3-14). Deshalb wurde ein (*S*)-Amino-propan-1,2-diol-Linker verwendet, dessen Synthese und Einbau in DNA in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* entwickelt wurde.^[2, 97, 323]

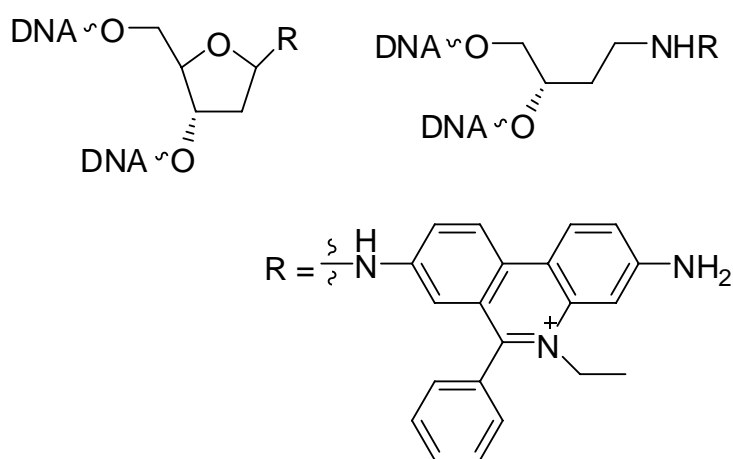


Abbildung 3-14: (*S*)-Amino-propan-1,2-diol als Ersatz für die 2'-Desoxyribose; R = Ethidium-Basensurrogat.

In der Abbildung 3-15 ist die Syntheseroute zur Herstellung des Ethidium-Nukleosids zusammengefasst. Zunächst wurden die beiden exocyclischen Aminofunktionen von **16** mit Chlorameisensäureallylster geschützt. Anschließend wurde mit 1,3-Diodpropan der Stickstoff in

der 5-Position des Phenanthridingerüsts von **17** alkyliert. Durch Umsetzung von **18** mit dem Aminopropandiollinker **23** wurde das Ethidium-Basensurrogat **19** erhalten. Im nächsten Schritt wurden die Alloc-Schutzgruppen von **19** durch die Trifluoracetylgruppen ersetzt. Dies geschieht in zwei Schritten und es wurde **21** erhalten. Für den anschließenden Einbau in DNA musste **24** noch mit der β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-phosphoramiditgruppe versehen werden, um den fertigen DNA-Baustein **22** zu erhalten.

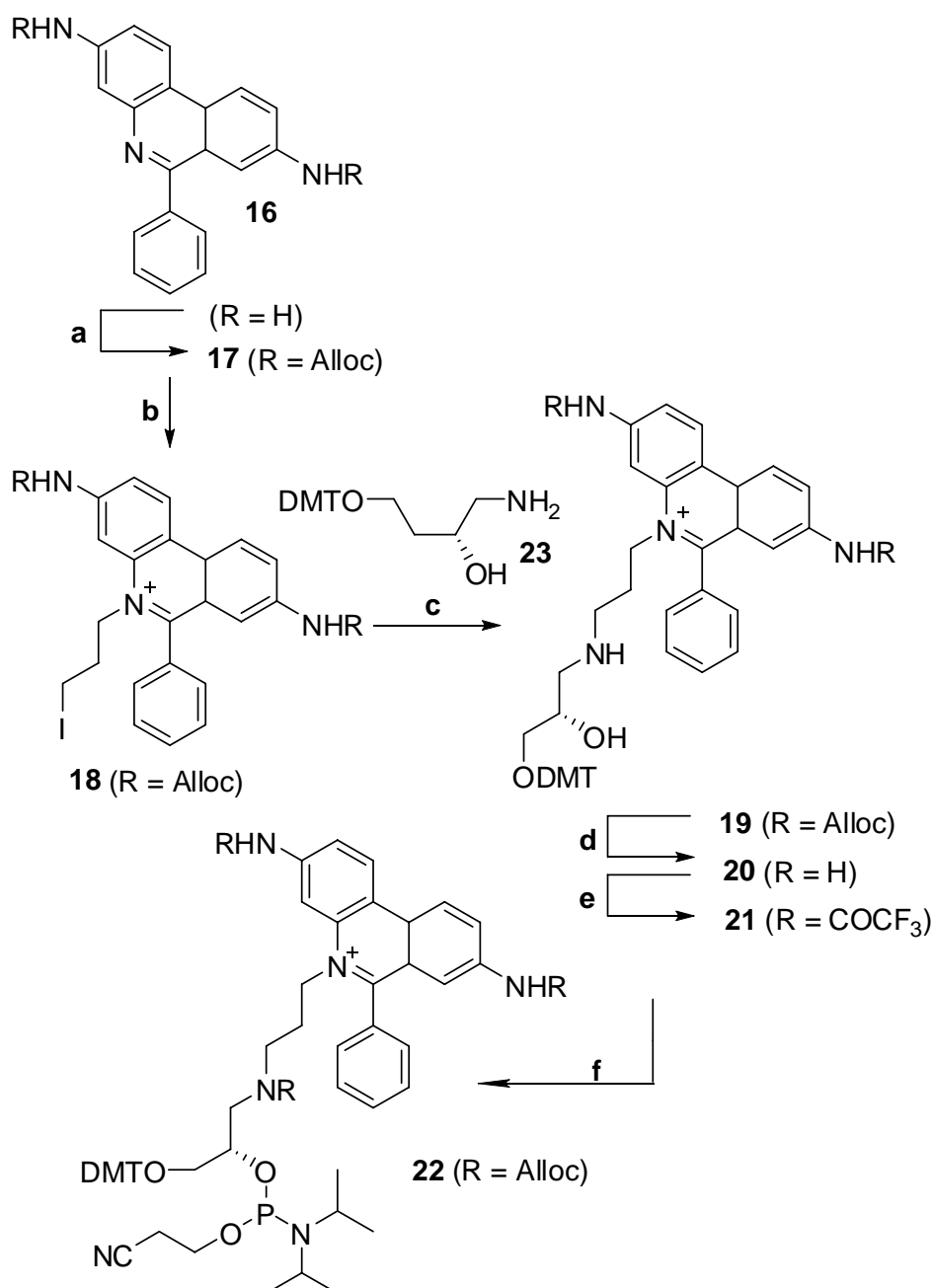


Abbildung 3-15: Syntheschema zur Darstellung des DNA-Bausteins **22**; a) ClCOOCH₂CH=CH₂, CH₂Cl₂, RT, 24 h, 98 %; b) I-(CH₂)₃-I, THF, 65 °C, 9 Tage, 82 %; c) **7**, DIPEA, DMF, RT, 55 h, 87 %; d) Bu₃SnH, Pd[P(Ph₃)]₄, PPh₃, CH₂Cl₂/ H₂O 300:1, RT, 90 min, 90 %; e) (CF₃CO)₂O, CH₂Cl₂/ Py 5:1, 0 °C, 10 min, RT, 10 Minuten, 67 %; (f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 45 min.

3.2.2 Darstellung und Charakterisierung der ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotide

Für die Darstellung der ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotide wurden die Phosphoramidite **3** und **22** in Acetonitril gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Mit Hilfe des modifizierten Kupplungsprotokolls, das mit einer Kupplungszeit von jeweils 1 Stunde für die modifizierten Phosphoramidite und je zwei Kupplungszyklen, ließ sich eine gute Kupplungseffizienz erreichen. (s. Abbildung 3-16).

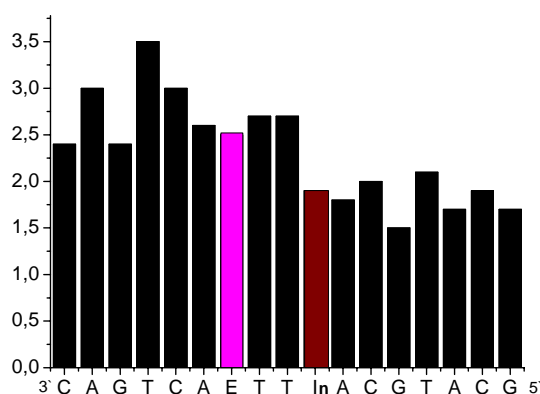


Abbildung 3-16: Beispiel des Tritylmonitors der erfolgreichen Synthese der ethidium- und indolmodifizierten DNA E1. **E** = Ethidium, **In** = Indol-Nukleosid

Die Abspaltung und Aufreinigung der ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotide erfolgt nach den Vorschriften aus der Literatur.^[97]

Für die Untersuchung des Ladungstransfer und zur Überprüfung des DETEQ-Konzeptes wurden folgende Duplexe synthetisiert (s. Abbildung 3-17). Als Gegenbase für das Ethidium-Basensurrogat und das Indol-Nukleosid wurde jeweils C gewählt. Obwohl beide modifizierte DNA-Bausteine **3** und **22** als universelle Basen gelten, war die Wahl der Gegenbase nur beim Ethidium-Basensurrogat willkürlich. Beim Indol-Nukleosid wurde die Gegenbase gezielt C gewählt, um die Vergleichbarkeit mit den ethidium- und 7-deazaguaninmodifizierten Duplexen zu erhalten, weil 7-Deazaguanin bevorzugt mit C paart. So wurde die Distanz zwischen Ladungsdonor und -akzeptor beibehalten. Diese betrug genauso zwei Basenpaare mit dem Unterschied, dass der Basenpaar anstatt T-C- aus T-T-Basenpaar bestand.

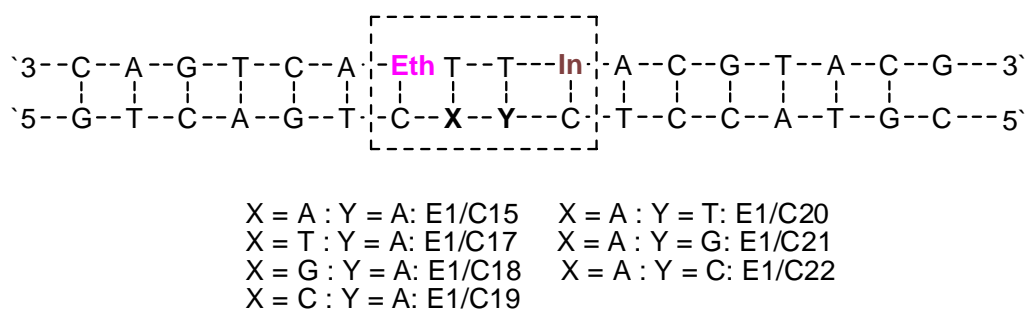


Abbildung 3-17: Sequenzen der ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotide. **Eth** = Ethidium-Nukleotidanalogen, **In** = Indol-Nukleotid. Als komplementäre Gegenbase zu **Eth** und **In** wurde jeweils die C Base gewählt.

Bei den Absorptionmessungen konnte das, für das interkalierte Ethidium charakteristische, Absorptionsmaximum bei ca. $\lambda = 530$ nm nachgewiesen werden (s. Abbildung 3-18).

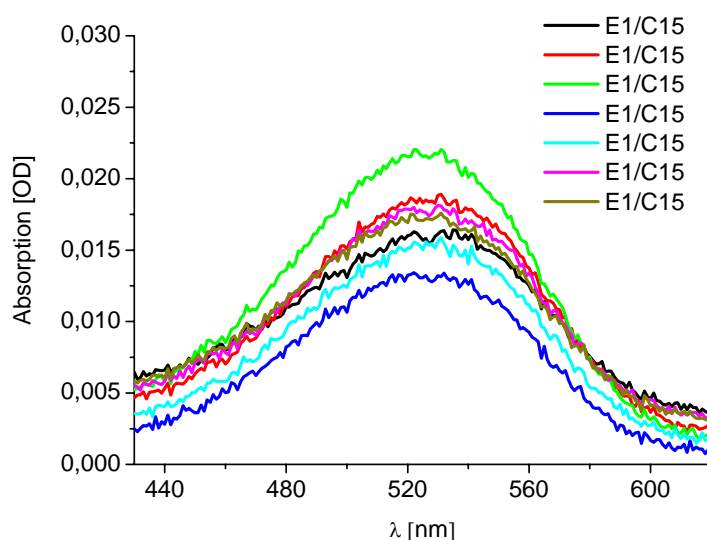


Abbildung 3-18: Absorptionsspektren der ethidium- und indolmodifizierten DNA. Die Proben enthalten 2,5 μM DNA in 10 mM NaP_i bei pH 7.

Um mehr Informationen über den Einfluss des Donor-Akzeptor-Systems auf die Konformation der Duplexe **E1/C15-E1/C21** zu erhalten, wurden CD-Spektren aufgenommen (s. Abbildung 3-19). Alle Duplexe weisen einen, für B-DNA typischen Verlauf zwischen 200-300 nm, mit einem Nulldurchgang bei ca. 260 nm hin. Somit haben die Ethidium- und Indol als artifizielle Basensurrogate keinen signifikanten strukturellen Einfluss auf die Gesamtkonformation der Duplexe.

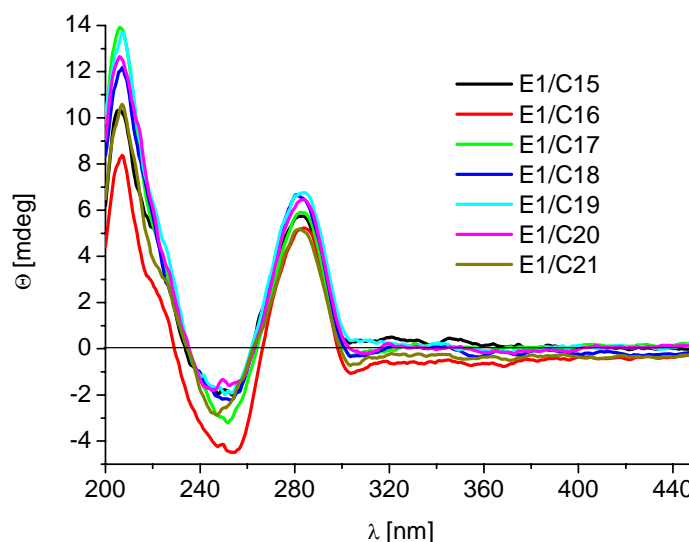


Abbildung 3-19: Die CD-Spektren der Duplexen **E1/C15-21**. Die Proben enthalten 2.5 μM DNA, 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl bei pH 7.

Die Schmelztemperaturmessungen von **E1/C15-E1/C21** zeigen, dass sich die thermische Destabilisierung im Vergleich zur indolmodifizierten DNA (s. Tabelle 3-3) durch den Einbau des Ethidium-Chromophors und Indol-Nukleosids noch verstärkt.

Tabelle 3-3: Schmelztemperatur der Duplexe **E1/C15-21**. Die Proben enthalten 2.5 μM Duplex, 250 mM NaCl, 10mM NaP_i , pH7.

Duplex	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$] ^b
E1/C15	46 (65) ^a	-19
E1/C16	45	-20
E1/C17	45	-20
E1/C18	45	-20
E1/C19	45	-20
E1/C20	52	-13
E1/C21	44	-21

a = Schmelztemperatur des unmodifizierten Duplexes beträgt 65 $^{\circ}\text{C}$; **b** = Differenz aus unmodifizierten und aus ethidium- und indolmodifizierten Duplex.

Mittels der Fluoreszenzspektroskopie wurden die ethidium- und indolmodifizierte Duplexe (**E1/C15-E1/C21**) auf das DETEQ-Konzept untersucht (s. Abbildung 3-20). Das Fluoreszenzmaximum bei $\lambda = 630$ nm ist typisch für interkaliertes Ethidium. Die stärkste Löschung ist beim richtig gepaarten Duplex **E1/C15** zu beobachten. Für die fehlgepaarten Duplexe **E1/C16-E1/21** gilt, dass die Emission im Vergleich zu **E1/C15** gering erhöht ist. Die größte Emission wird

beim Duplex **E1/C17** beobachtet. Fallende Fluoreszenzlöschung wird mit effizientem Ladungstransfer verbunden. Hiermit wird gezeigt, dass der oxidative Ladungstransfer im Ethidium-Indol-System im richtig gepaarten Duplex **E1/C15** im Vergleich zu den fehlgepaarten Duplexen **E1/C16-21** am effektivsten ist.

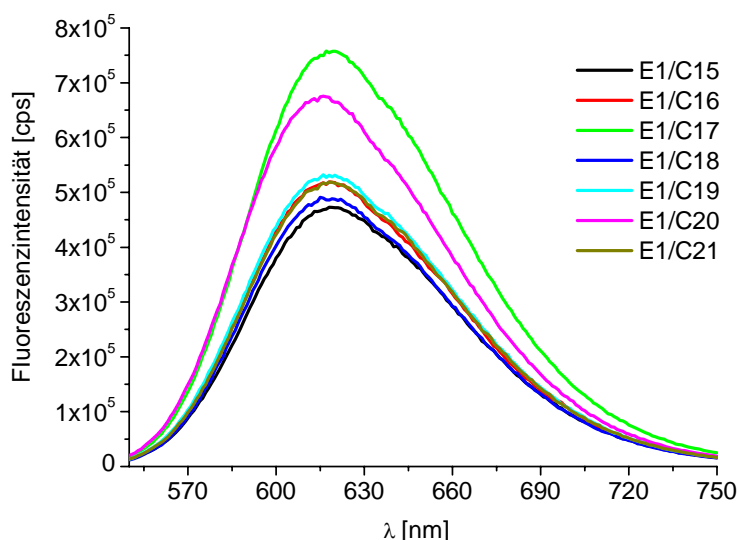


Abbildung 3-20: Die Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) der Duplexe **E1/C15-21**. Die Proben enthalten $2.5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaP_i bei pH 7.

Grund für diese Unterschiede könnte sein, dass die konformelle Störung im Ethidium-Indol-System durch beide Nukleoside derart ausgeprägt ist, dass sich bei nur einer weiteren Basenfehlpaarung das Ladungstransferverhalten wenig ändert und somit für das DETEQ-Konzept ungeeignet ist (s. Tabelle 3-3).

Eigentlich wäre dieses Ergebnis, wenn man die Vorarbeiten am Eth-Z-System nicht kennt, zu erwarten gewesen, denn bei richtig gepaarten Duplexen (**E1/C15**) ist die strukturelle Störung am geringsten und somit der Ladungstransfer am effizientesten. Interessanterweise zeigen vergleichbare ethidiumbasierte Donor-Akzeptor-Systeme, wo als Lochakzeptor anstatt Indol-Nukleosid (**1b**) der In'-Basensurrogat (Eth-In'-System)^[28] und 7-Deazaguanin (Eth-Z-System)^[25] verwendet wurde, ein genau umgekehrtes Ergebnis. Die Fluoreszenzspektren der fehlgepaarten Duplexen zeigen im Vergleich zum richtig gepaarten Duplex eine geringere Fluoreszenzintensität. Bei Eth-Z-System sind die Fluoreszenzintensitäten der fehlgepaarten Duplexen derart gelöscht, dass die Detektion der Basenfehlpaarung möglich wird.

3.2.3 Entwicklung eines *Molecular Beacons* auf Ethidium- und Indol-Basis

Um die Anwendbarkeit des Ladungstrfers in den ethidium- und indolmodifizierten DNA weiter zu untersuchen, wurden die semikomplementären Stamm-Duplexe (**E2/I3** und **E3/I3**) synthetisiert. Diese sollen nach dem Prinzip des *Molecular Beacons* (MB) untersucht werden (s. Abbildung 3-21).

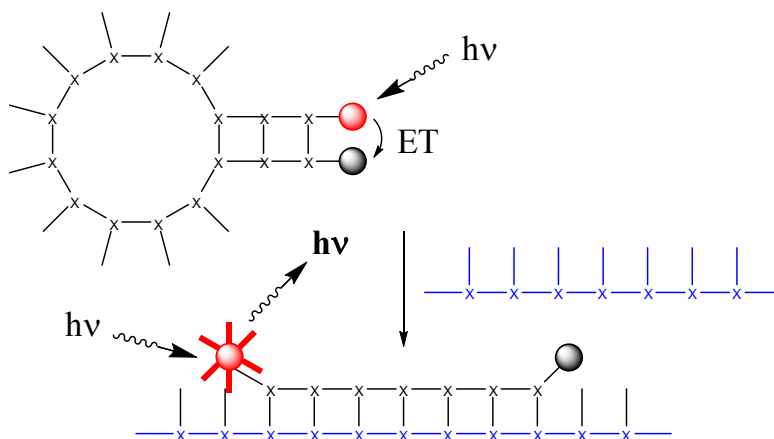


Abbildung 3-21: Prinzip eines *Molecular Beacons* auf Basis des Elektronentransfers. Die Fluoreszenz vom Ladungsdonor ist im Einzelstrang durch die räumliche Nähe des Ladungsakzeptors gelöscht. Durch die anschließende Zugabe des richtig gepaarten Gegenstrangs wird der Donor-Akzeptor-Paar, durch die Bildung des komplementären Duplexes, räumlich getrennt und der Ladungsdonor fluoresziert.

Mit Semikomplementarität ist gemeint, dass die Duplexe nur im Bereich auf beiden Seiten des Ethidiums um weitere vier Basenpaaren komplementär sind (**blau**). Ab dem fünften Basenpaar sind die restlichen Basenpaare fehlgepaart (**grün**). Weiterhin wurde die Sequenz so gewählt, dass das Ethidium- und Indol-Nukleosid sich entweder direkt gegenüber stehen (**E2/I3**) oder wie im Duplex (**E3/I3**) um eine Base verschoben sind (s. Abbildung 3-22). Mit dieser Platzierung wird nach dem Prinzip des *Molecular Beacons* gewährleistet, dass die Fluoreszenz vom Ethidium durch das Indol effizient gelöscht wird. Diese semikomplementären Duplexe (**E2/I3** und **E3/I3**) sollen anschließend durch Titration mit den richtig gepaarten Gegensträngen **C22** und **C23**, in Bezug auf **E2** und **E3** aus thermodynamischen Gründen zu richtig gepaarten ethidiummodifizierten Duplexen (**E2/C22** und **E3/C23**) rehybridisieren. Diese ethidiummodifizierten Duplexe (**E2/C22-E3/C23**) haben keinen Ladungsakzeptor, somit wird der Ladungstransfer unterbunden und im Vergleich zum doppelmarkierten Duplex steigt die Emission an ethidiummodifizierten Duplexe (**E2/C22**) und (**E3/C23**) verwendet.

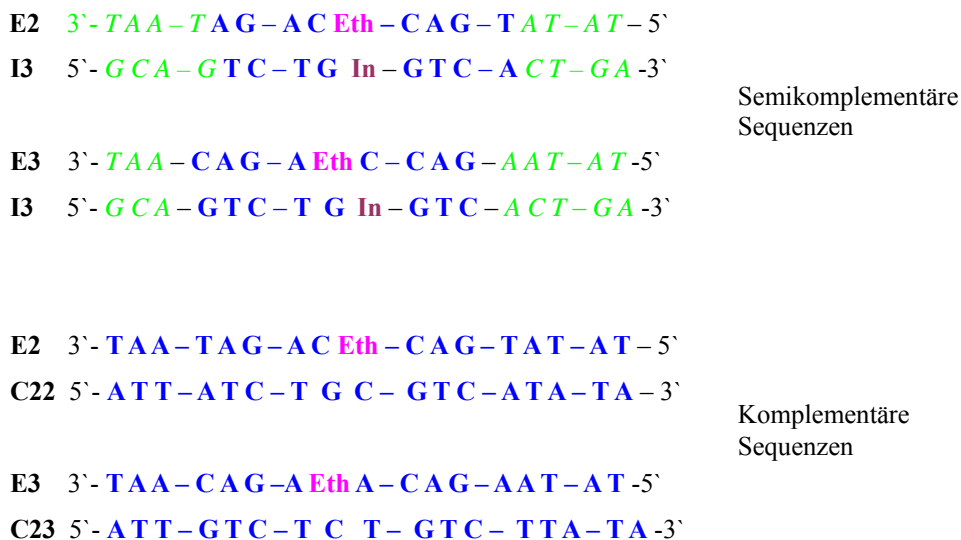


Abbildung 3-22: Die Sequenzen für die semikomplementäre Titration. Komplementäre Basenpaare hier blau dargestellt, fehlgepaarte Basenpaare grün dargestellt.

Die Titration wurde in 0.16 eq Schritten mit **C22** und **C23** durchgeführt und mit dem Fluoreszenzspektrometer verfolgt (s. Abbildung 3-23). Als Endpunkt der Titration wird bezeichnet, wenn trotz der weiteren Zugabe von **C22-23** das Emissionsmaximum nicht weiter steigt. Als interne Referenzmaxima wurden die komplementären.

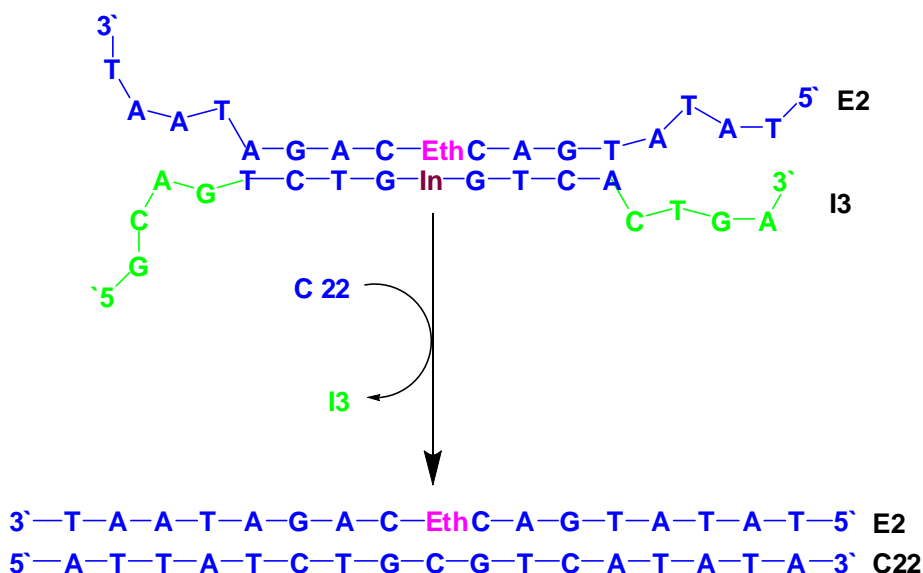


Abbildung 3-23: Prinzip der Verdrängung des semikomplementären Duplexes **E2/I3** durch das komplementäre Oligonukleotid **C22**. Die Probe **E2/I3** enthält zu Beginn 2.5 μ M DNA, 10 mM NaP_i, pH 7. Der dazu titrierte Gegenstrang enthält 2.5 μ M **E2/I3** und 20 μ M **C22**, 10 mM NaP_i, pH 7.

Beide Emissionsspektren der Duplexe (**E2/C22-E3/C23**) haben ein Emissionsmaximum bei der Wellenlänge $\lambda = 622$ nm und sind beide um 6 nm ($\lambda = 615$ nm) bzw. um 12 nm ($\lambda = 609$ nm) blauverschoben (s. Abbildung 3-24). Die Blauverschiebung resultiert aus der besseren Interkalation des Ethidiums. Das Titrationsende der beiden Duplexe (**E2/I3**→**E2/C22** und **E3/I3**→**E3/C23**) wurde bei etwa 2 eq an **C22** bzw. **C23** erreicht.

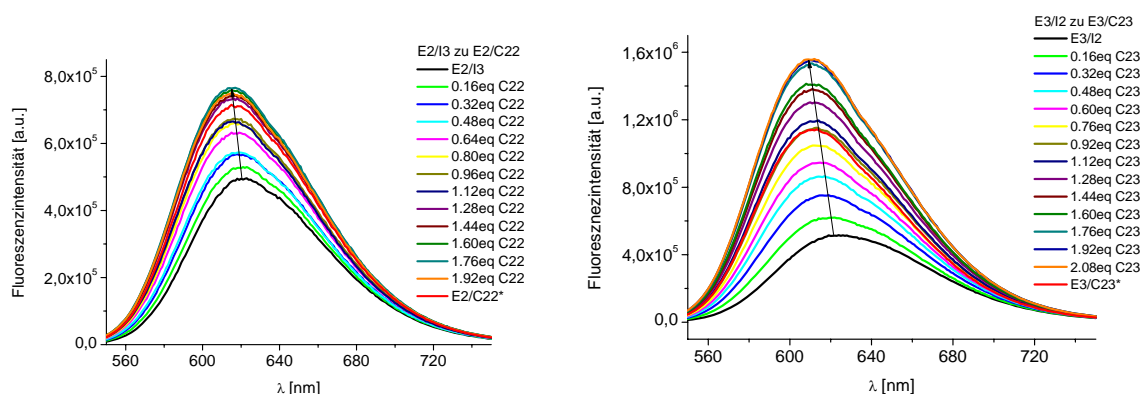


Abbildung 3-24: Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm) der semikomplementären Titration. *Links:* Die Probe **E2/I3** enthält zu Beginn 2,5 μM DNA, 10 mM NaP_i , pH 7. Der dazu titrierte Gegenstrang enthält 2,5 μM **E2/I3** und 20 μM **C22**, 10 mM NaP_i , pH 7. *Rechts:* Die Probe **E3/I3** enthält zu Beginn 2,5 μM DNA, 10 mM NaP_i , pH 7. Der dazu titrierte Gegenstrang enthält 2,5 μM **E3/I3** und 20 μM **C23**, 10 mM NaP_i , pH 7.

In der Abbildung 3-25 ist die integrierte Fluoreszenz der beiden Titrationen dargestellt. Die rote Kurve gibt den Duplex **E2/I3**→**E2/C22** wieder und die blaue den Duplex **E3/I3**→**E3/C23**.

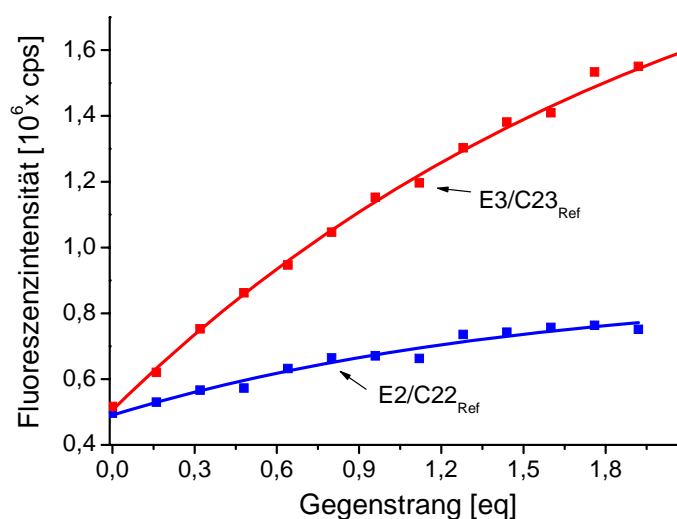


Abbildung 3-25: Integrierte Fluoreszenz bei der Titration der semikomplementären Duplexe.

Die Ergebnisse der Titration konnten mit der Schmelztemperaturanalyse bestätigt werden (s. Tabelle 3-4). Die Schmelztemperatur der richtig gepaarten Duplexe liegen, im Vergleich zu den

Fehlgepaarten, zwischen 8 °C und 11 °C höher. Interessanterweise ist zu beobachten, dass die Duplexe (**E2/I3** und **E2/C23**) stabiler sind, wenn sich das Ethidium- und Indol gegenüber stehen. Dies ist deshalb überraschend, da laut dem Fluoreszenzverhalten, das Ethidium in diesen Duplexen schlechter interkaliert sein soll.

Tabelle 3-4: Schmelztemperatur der Duplexe **E2/I3-E2/I3** und **E2/C22-E2/C23**. Die Proben enthalten 2.5 µM Duplex, 250 mM NaCl, 10mM NaP_i, pH7.

Duplex	T _m [°C]
E2/I3	39
E3/I3	36
E2/C22	47
E3/C23	47

3.3 Indolsulfonamidmodifiziertes Oligonukleotid

3.3.1 Hintergrund

Die Phenylsulfonylgruppe findet in der Organischen Chemie aufgrund ihrer Stabilität besonders als Schutzgruppe für Amine, Anwendung. Die Abspaltung erfolgt unter typischerweise stark basischen oder stark sauren Bedingungen. Aufgrund dieser extremen Bedingungen ist die Anwendung dieser permanenten Schutzgruppe begrenzt und es wird deshalb verstärkt nach milderen Abspaltungsbedingungen geforscht.^[305] Umezawa *et al.* berichtete schon 1969 über eine solche Entschützungs-methode.^[305b] Die Sulfonamide konnten in Anwesenheit des Reduktionsmittels Natriumtetrahydroboran und eines elektronenreichen Donors photochemisch gespalten werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird hier folgende Strategie verfolgt. Auf der Basis des Elektronentransfers soll ein Donor-Akzeptor-System entwickelt werden, das in der DNA eine „intramolekulare“ photochemische Spaltung des Sulfonamids durchführt. Das Indolsulfonamid-Nukleosid **7** ist ein elektronenarmes Aromat und soll als Elektronenakzeptor fungieren, der chemisch analysierbar ist. Abhängig von Reduktionspotentials von **7** sollen verschiedene Elektronendonoren für photochemischen Entschätzung, getestet werden. Als Donoren wurden Ethidium (**16**), Pyren und Phenothiazin gewählt (s. Tabelle 3-5), gleichzeitig wird das Reduktionpotential von **7** bestimmt.

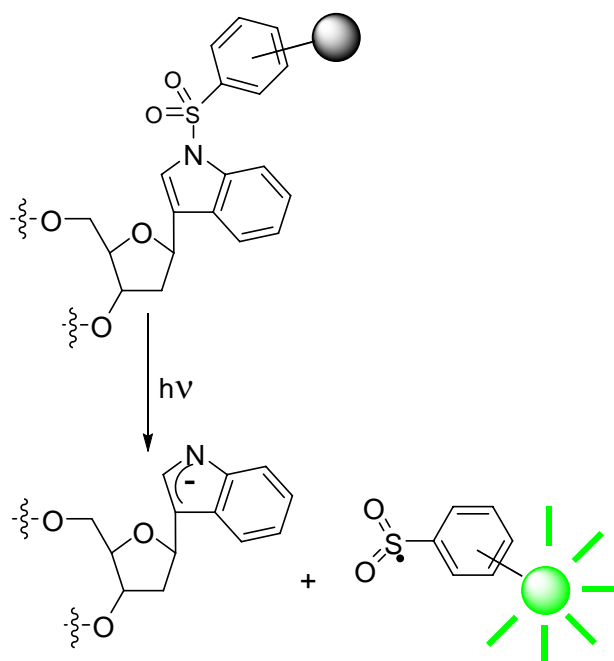
Tabelle 3-5: Redoxpotentiale und Singulett-Singulett-Energie der angeregten Ladungsdonoren.

D	E_{red} [V]	E₀₀ [eV]
Eth ²⁺ / Eth ⁺⁺	-0.52	2.2
Py / Py ⁺⁺	-1.8	3.25
Ptz / Ptz ⁺⁺	-2.0	- 2.9

D = Elektronendonator, **E_{red}** = Redoxpotential, **E₀₀** = Singulett-Singulett-Energie, **Eth** = Ethidiumbromid **16**, **Py** = Pyren, **Ptz** = Phenothiazin.

Die Ausbeute der Entschützung von **7** wird anhand des ¹H-NMR verfolgt. Nach der Entschützung entsteht **1B** als Produkt. Der Ladungsdonor mit der größten Ausbeute soll anschließend für die photochemische Entschützung der indolsulfonamidmodifizierten DNA (Is-DNA) verwendet werden. Die Entschützung soll mittels HPLC verfolgt und analysiert werden. Zuerst wird das Indolsulfonamid-Nukleosid **7** spektroskopisch untersucht.

Ideal wäre, wenn die Phenylsulfonyl-Gruppe einen Chromophor-Substituenten hätte, der erst nach der Abspaltung eine charakteristische Absorption oder Emission hätte (s. Abbildung 3-26). Fernziel solcher chemischer Detektoren ist die Gendetektion durch Absorption.

**Abbildung 3-26:** Darstellung eines chemischen Akzeptors, der erst nach der photochemischen Reaktion detektierbar ist.

Die Reaktion der photochemischen Entschützung der Phenylsulfonylschutzgruppe erfolgt nach diesem Mechanismus (s. Abbildung 3-27).

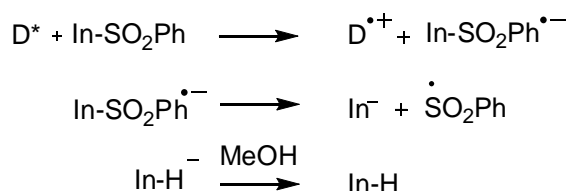


Abbildung 3-27: Der Mechanismus für photochemische Spaltung von Indolsulfonamid-Nukleosid (7).

3.3.2 Spektroskopische Untersuchungen des 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-indols (7)

Die Absorptionmessungen (s. Abbildung 3-28 *links*) wurden in Methanol (MeOH) und Acetonitril (MeCN) durchgeführt. In beiden Lösungsmitteln zeigt die Verbindung **7** ein ähnliches spektrales Verhalten wie Verbindung **1b** und **14**. Das Emissionsmaximum liegt in beiden Lösungsmitteln bei $\lambda = 400$ nm (s. Abbildung 3-28 *links*), bei $\lambda = 350$ nm ist ein lokales Maximum erkennbar (s. Abbildung 3-34).

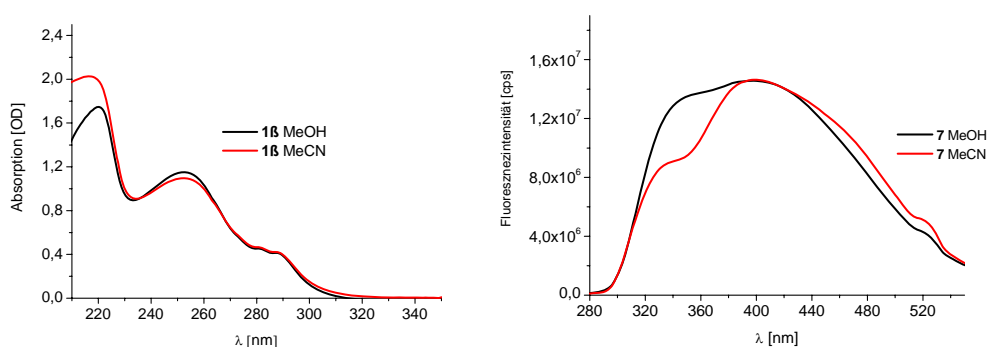


Abbildung 3-28: *Links:* Die Absorptionsspektren des Indolsulfonamid-Nukleosids **7** in Methanol und Acetonitril. *Rechts:* Die Emissionsspektren von **7** in Methanol und Acetonitril bei gleicher optischer Dichte.

Für die Wahl eines geeigneten Elektronendonors für die photochemische Entschützung von **7**, bedarf es der Kenntnis des Reduktionspotentials des Akzeptors **7**. Deshalb wurden elektrochemische und spektroelektrochemische Messungen durchgeführt.

Der Reduktionspotential von Indolsulfonamid-Nukleosid **7** wurde durch Cyclovoltametrie in Acetonitril bestimmt. In dem verwendeten Messaufbau wurde keine geeichte Referenzelektrode verwendet, die Eichung erfolgte mit dem gängigen Standard Ferrocen (Fc). Für die Reduktion der Verbindung **7** ergibt sich ein irreversibles Halbstufenpotential $E_{1/2} \sim -2.3$ V gg. Ferrocen (Fc/Fc^+). Anhand der Tabellen lässt sich dann das Redoxpotential von **7** gegenüber der Normalwasserstoffelektrode abschätzen.^[323] Man erhält ein Redoxpotential für $\text{Is}/\text{Is}^{\bullet-}$ zwischen

$E_{\text{red}} \sim -2.0 \text{ V}$ und $E_{\text{red}} \sim -1.8 \text{ V}$ (vs NHE).

Das Absorptionsspektrum des Radikalanions ($\text{Is}^{\bullet-}$) von **7** zeigt im Bereich zwischen $300 \text{ nm} < \lambda > 350 \text{ nm}$ eine flache unstrukturierte Absorptionsbande. Eine deutliche Abnahme der Absorption ist bei $\lambda = 217 \text{ nm}$ und im Bereich zwischen $300 \text{ nm} < \lambda > 350 \text{ nm}$ zu beobachten, isosbestische Punkte bei 233 nm und 296 nm . Steigerte man das angelegte Potential über -1.9 V wird eine Entschüttung beobachtet. Eine Umwandlung ist nicht reversibel (s. Abbildung 3-29).

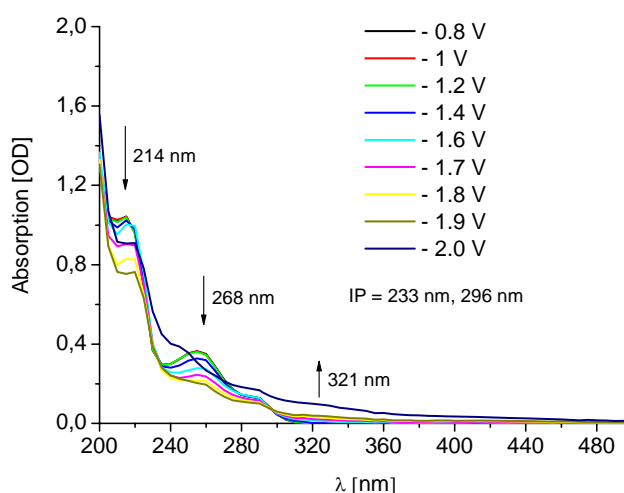


Abbildung 3-29: UV/Vis-Spektren der Spektroelektrochemie. Die Potentiale sind gegen willkürlich gewählten Bezugspunkt angegeben. 0.5 mM von **7** in Acetonitril.

3.3.3 Darstellung des indolsulfonamidmodifizierten Oligonukleotides

Beim Einbau des Indolsulfonamid-Nukleosids **7** als modifizierte DNA-Base durch die automatisierte DNA-Festphasensynthese wurde wie bei der Verbindung **3** verfahren (s. Abbildung 3-30).

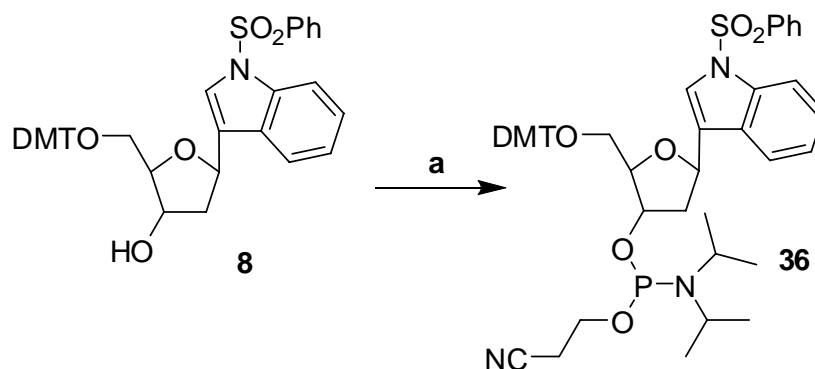


Abbildung 3-30: Darstellung des Phosphoramidits des indolsulfonamidmodifizierten Nukleosids **36**: a) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit, NEt_3 , DCM, RT, 45 min, 95%.

Das Phosphoramidit **36** wurde in Acetonitril gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Mit Hilfe eines modifizierten Kupplungsprotokolls mit einer Kupplungszeit von 60 min statt 1.6 min lässt sich eine gute Kupplungseffizienz erreichen (s. Abbildung 3-31).

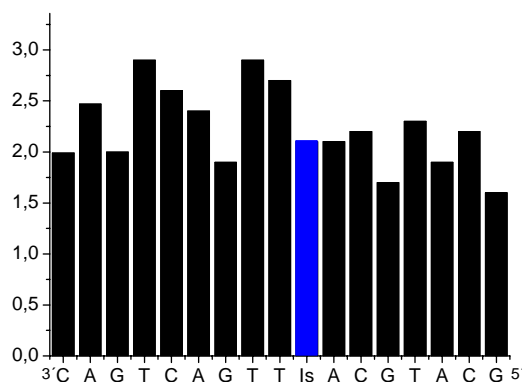


Abbildung 3-31: Beispiel des Tritylmonitors der erfolgreichen Synthese der indolsulfonamidmodifizierter DNA **Is1**.

Als komplementäre Gegenbase wurde, wie bei **3**, C gewählt. Nach der erfolgreichen Synthese wurde die Is-DNA nach Standardbedingungen aufgearbeitet (s. Abbildung 3-32). Die Aufreinigung der Oligonukleotide wurde mittels RP-HPLC durchgeführt, zur Detektion der Is-DNA wurden die Wellenlängen $\lambda = 260$ und 280 nm gewählt.



Abbildung 3-32: Sequenz des indolsulfonamidmodifizierten Oligonukleotids. **Is** = Indolsulfonamid-Nukleotid.

3.3.4 Untersuchungen zum Ladungstransfer in einer Indolsulfonamid-DNA

Für die photochemische Entschützung in Is-DNA mittels Ladungstransfer wird für den Ladungsakzeptor ein Donor benötigt. Als photoanregbare redoxaktive Ladungsdonoren wurden Ethidium, Pyren und Phenothiazin gewählt. Nach Bestimmung des Redoxpotentials der Verbindung **7** besitzt nur Phenothiazin ($E_{\text{red}} = -2.0$ V) die ausreichende Triebkraft für eine intermolekulare, photochemische Entschützung von indolsulfonamismodifizierten Nukleosid **7**, die anhand der Vorversuche bestätigt werden konnte. Während bei der Entschützung mit Pyren eine Bildung von **1b** noch in Spuren (4 %) nachgewiesen werden konnte, war der Vorversuch mit Ethidium erwartungsgemäß negativ (s. Tabelle 3-6). Demnach besitzt Indolsulfonamid-Nukleosid **7** ein Redoxpotential von $E_{\text{red}} \sim -1.9$ V.

Die Vorversuche mit **7** (etwa 0.2 mM) erfolgten in einem 10 ml Rundkolben und wurde mit einer 75 Watt Xenonlampe vier Stunden lang im Acetonitril bestrahlt. Die Wellenlängen $\lambda < 305$ nm wurden herausgefiltert, um selektiv die Chromophore anzuregen. Die Ausbeute an **1B** wurde mittels ^1H -NMR ermittelt. Dafür diente die Intensität des NH-Signal ($\delta = 10.91$ ppm) der Verbindung **1B** im Verhältnis zu $\text{H1}'$ ($\delta = 5.36$ ppm) der Verbindung **7**. Die Umsätze der Entschützung werden in Tabelle 3-6 dargestellt.

Tabelle 3-6: Redoxpotentiale der angeregten Ladungsdonoren und deren prozentuelle Entschützungsrate.

Elektronendonator	E_{red} [V]	E_{00} [eV]	Intensität des NH-Signals [%]
Eth ²⁺ / Eth ⁺⁺	-0.52	2.2	-
Py / Py ⁺⁺	-1.8	3.25	4
Ptz / Ptz ⁺⁺	-2.0	- 2.9	64

Eth = Ethidiumbromid **16**, **Py** = Pyren, **Ptz** = Phenothiazin, k.A. = keine Angabe, E_{00} = Singulett-Singulett-Energie, **D** = Elektronendonator, E_{red} = Redoxpotential,

Basierend auf diesen Vorexperimenten wurde Phenothiazin zu der indolsulfonamidmodifizierten DNA (**Is1/C15**) in äquivalentem Maßstab titriert. Die DNA-Lösung wurde 75 W Xenonlampe acht Stunden lang bestrahlt. Während der Bestrahlung wurden in regelmäßigen Abständen 100 μL der DNA-Lösung entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Signalstärke des unmarkierten Gegenstranges wurde als interner Standard herangezogen. Am Ende der Bestrahlung wurde die restliche Probe entsalzt und mittels ESI-MS die Produktbildung überprüft (s. Abbildung 3-33).

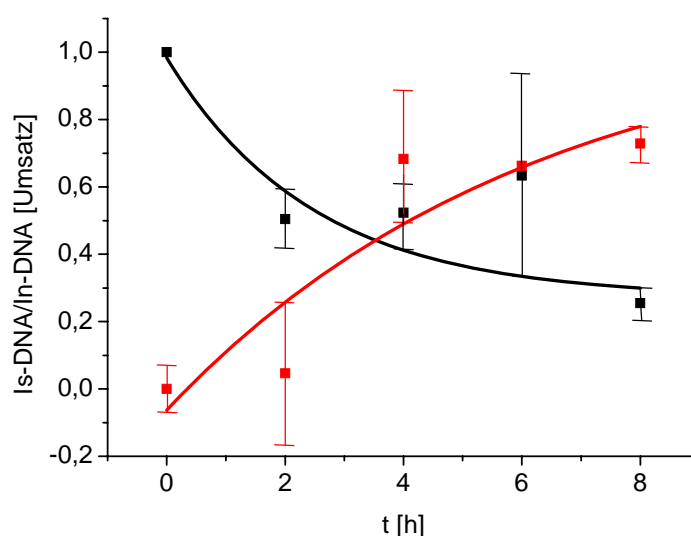


Abbildung 3-33: Abnahmegeschwindigkeit des Is-DNA-Duplexes vs. Bildungsgeschwindigkeit der In-DNA. **Is** als Indolsulfonamid-Nukleosid (**7**) und **In** als gebildetes Indol-Nukleosid (**1B**).

Die HPLC-Analysen zeigen die Abnahme der Is-DNA und die Bildung des indolmodifizierten DNA (In-DNA). Ein weiterer Hinweis bzw. indirekter Nachweis für die erfolgreiche Entschützung kann durch den Vergleich der Referenzzeiten nach Koinjektion der jeweiligen Referenzproben in HPLC-Analysen genommen werden. Ein analytischer Nachweis durch ESI-MS konnte trotz Entsalzung wegen des Phosphatpuffers in der Probe nicht geliefert werden.

1-Phenylsulfonyl-3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**7**) kann als chemischer Elektronenakzeptor betrachtet werden, denn die Vorversuche haben gezeigt, dass die Detosylierung photochemisch möglich ist. Demnach könnte die Phenylsulfonyl-Gruppe bei entsprechender Modifizierung als optische Sonde dienen, die erst nach der Abspaltung absorbiert oder fluoresziert. Ein wesentlicher Vorteil dieser Verbindung ist, im Vergleich zu anderen Indolverbindungen, dass sie licht- und luftstabil ist.

3.4 Zusammenfassung

Für die Untersuchung des oxidativen Lochtransfers wurde das über C-3 verknüfte β -Indol-Nukleosid **7** synthetisiert und in die DNA eingebaut. Die erhaltenen DNA-Duplexe wurden optisch und spektroelektrochemisch untersucht und charakterisiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Ergebnissen ähnlich indolmodifizierter DNA aus der Literatur verglichen.^[28, 324-327]

Die indolmodifizierte DNA weist eine geringere thermische Stabilität im Vergleich zur unmodifizierten DNA auf. Diese Temperaturerniedrigung konnte sowohl dem Indolring als auch dem azyklischen nicht-nukleosidischen Linker zuordnet werden. In dieser Arbeit wurde die destabilisierende Wirkung des Indols als artifizielle Base bestätigt mit dem Nachweis, dass diese Schmelztemperaturerniedrigung vom Indolring verursacht wird. Die Schmelztemperaturerniedrigung könnte aufgrund der *anti*-Konformation des Indol-Nukleosids im Oligonukleotid sein. Das Indol verhält sich als universelle Base ohne Paarungspräferenz. Die Ergebnisse der optischen Spektroskopie zeigen, dass sich das Indol-Nukleosid **1B** nur als Lochakzeptor, aber nicht als Fluoreszenzsonde eignet.

Für die Untersuchung des Lochtransfers entsprechend dem DETEQ-Konzept wurde Ethidium **16** als photoinduzierbarer Lochdonor verwendet. In Arbeiten unserer Gruppe konnten bereits ähnliche Arbeiten mit Ethidium als Ladungsdonor und In²⁺-Basensurrogat bzw. Deazaguanin als Ladungsakzeptoren durchgeführt werden (Eth-In²⁺- und Eth-Z-System). In diesen Arbeiten konnte

gezeigt werden, dass bei einem Donor-Akzeptor-Abstand von zwei dazwischenliegenden Basen einzelne Basenfehlpaarungen durch Fluoreszenz nachweisbar sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das DETEQ-Paar Ethidium/ Indol getestet. Beim richtig gepaarten Duplex (**E1/C15**) war der Ladungstransfer am effektivsten. Die anderen Duplexe zeigen ähnliche oder erhöhte Fluoreszenzintensität. Somit ist das Ethidium/ Indol-Paar für das DETEQ-Konzept nicht besonders geeignet.

Effektiver Lochtransfer konnte nach dem Prinzip des *Molecular Beacons* nachgewiesen werden. Hier wurden die semikomplementären ethidium- und indolmodifizierten Duplexe mit komplementären Gegensträngen titriert, wobei sich ethidiummodifizierte Duplexe bildeten. Der Titrationsverlauf wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt. Diese zeigten bei der Dehybridisierung der doppelmarkierten Duplexe aufgrund der räumlichen Trennung der Chromophore eine steigende Emission.

Das Indolsulfonamid-Nukleosid **7** kann aufgrund seines elektronenarmen Aromats als Elektronenakzeptor dienen. So wurde 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**7**) synthetisiert und in die DNA (Is-DNA) eingebaut. Dieser Elektronenakzeptor enthält eine Phenylsulfonyl-Schutzgruppe, die photochemisch abspaltbar ist. Hier wurde eine intermolekulare, photochemische Entschützung des Elektronenakzeptors **7**, basierend auf dem reduktivem Elektronentransfer, durchgeführt. Als photoinduzierter Elektronendonator wurde Phenothiazin verwendet. Die Entschützung von **7** wurde in Vorexperimenten mit ^1H -NMR und bei Is-DNA mit der HPLC verfolgt. Die Vorversuche und die HPLC-Auswertung bestätigen die Entschützung von **7** zu **1B** bzw. Is-DNA zu In-DNA.

4. Untersuchungen zum reduktiven Elektronentransfer im metallkoordinierten DNA System

4.1 Hintergrund

Durch die Untersuchung der elektronischen Eigenschaften der metallionenhaltigen DNA, wie z. B. die Elektronentransfereffizienz, erhofft man sich nanoskalige Metalldrähte für Schaltkreise entwickeln zu können (s. auch Kapitel 2.6).^[134, 226, 227] Um Elektronentransfer in M-DNA zu untersuchen, wurde folgender Ansatz verfolgt. Es wurde ein Donor-Akzeptor-System einer M-DNA synthetisiert und die Ladungstransfereffizienz photochemisch untersucht. Zum Schluss sollen die Ergebnisse mit ähnlichen, bereits publizierten Ergebnissen verglichen werden.

Zum besseren Verständnis wird hier auf das frühere zugrundeliegende Experiment kurz eingegangen. Das Ladungstransfer-System, das in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde, besteht aus 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**25**) als photoinduzierbarer Ladungsdonor und 2'-Desoxyuridin-5-bromuridin (**33**) als Ladungsakzeptor (s. Abbildung 4-1).^[317-319]

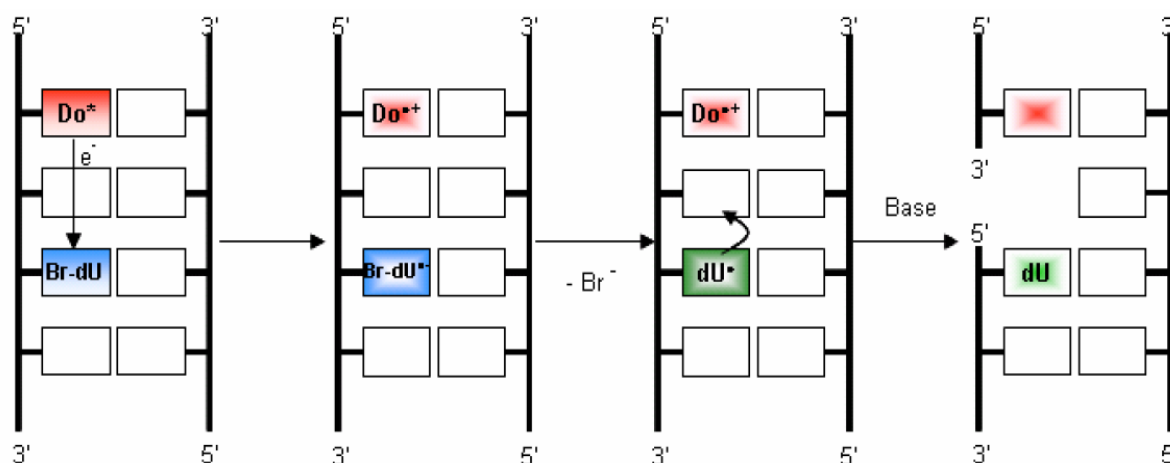


Abbildung 4-1: Schema des zu einem Strangbruch führenden Elektronentransfers in einem modifizierten DNA-Duplex; **Do** = Elektronendonor, **Br-dU 33** = Elektronenakzeptor.

Die Ladungstransfereffizienz wurde chemisch analysiert (s. Kapitel 2.1.3.3),^[66] da Brom-dU einen kinetischen Akzeptor darstellt. Dieser Akzeptor kann durch den angeregten Donor reduziert werden, der daraufhin ein Bromidion abspaltet. An dem entstehenden 2'-Desoxy-uridinradikal entsteht ein DNA-Schaden, der nach anschließender basischer Behandlung einen Strangbruch induziert, der mittels HPLC oder Gelelektrophorese nachweisbar und quantifizierbar ist. In diesem Experiment

konnte festgestellt werden, dass der Elektronentransfer durch DNA sowohl richtungs- als auch basensequenzabhängig ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überschusselektronen durch die Pyrimidinbasen übertragen werden, über Thymin jedoch effektiver als über Cytosine. Die unterschiedliche Basizität der intermediären Radikalanionen beeinflusst deren Eignung als Ladungsträger.^[61,66]

Für die Elektronentransferexperimente in dieser Arbeit wurde als metallvermittelte Base 2'-Desoxy-4-thiouridin (**34**) bzw. Thio-dU verwendet^[313, 320] und auf den beschriebenen Donor-Akzeptor-System untersucht. Für die Untersuchung des Elektronentransfers wurde Thio-dU in beiden Einzelsträngen in verschiedenen Positionen so eingebaut, dass nach der Duplexhybridisierung die Thio-dU-Basen entweder gegenüber oder versetzt zueinander stehen. In dieser Position können diese Basen Metallkationen über koordinative Bindungen im Duplex binden (s. Abbildung 4-2).

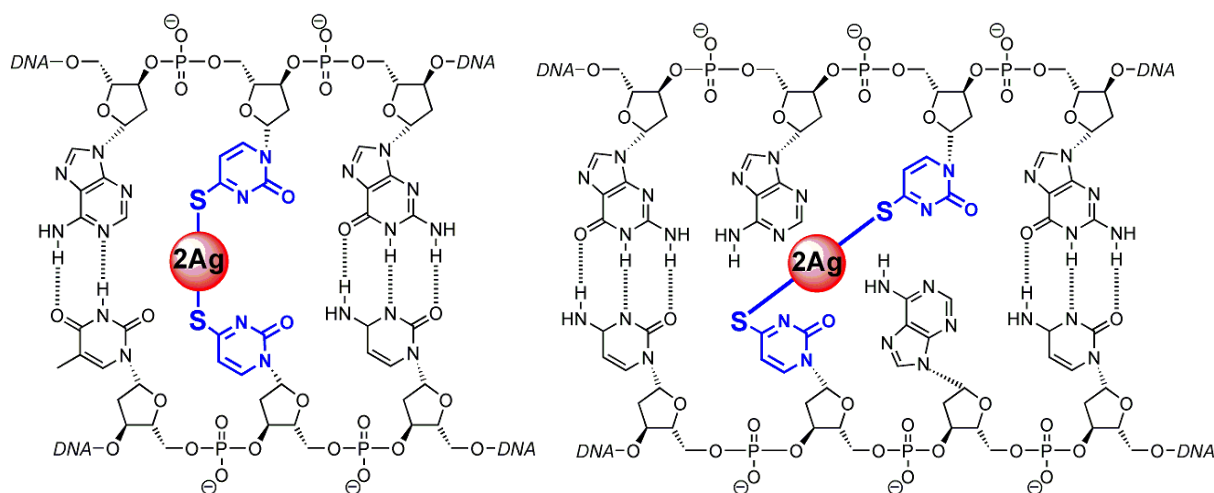


Abbildung 4-2: Metall-Basenpaare können sowohl gegenüber als auch versetzt zueinander stehen.

Die Zugabe von Metallkationen, in diesem Fall von Silberionen, erfolgte nach der Duplexhybridisierung. Vorteil der schwefelmodifizierten Uridine (s. Abbildung 4-3) ist, dass sie als einzähnige Liganden fungieren und dadurch selektiv einwertige Silberionen chelatisieren können.^[320] Ein weiterer Vorteil ist, dass diese modifizierte Base **34** im Vergleich zu anderen Chelatliganden^[313], sowohl über die Festphasensynthese als auch PCR in die DNA eingebaut werden kann.

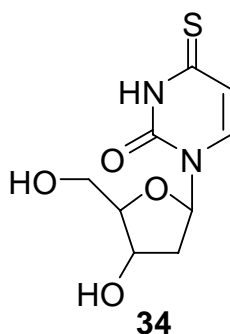


Abbildung 4-3: 2'-Desoxy-4-thiouridin (**34**) als metallvermittelte Base für die M-DNA.

In diesem Experiment wurde nur der langsamer verlaufende Elektronentransfer (Elektronentransfer Richtung 5'→3' anstatt 3'→5') genauer untersucht, da die Unterschiede zwischen den untersuchten DNA-Sequenzen über das Zeitfenster von 60 Minuten besser darzustellen waren. In den weiteren Ausführungen werden die modifizierten Uridine wie folgt abgekürzt: 2'-Desoxy-5-(10-methylphenothiazin)-uridin (**25**) wird mit Pz-dU, 2'-Desoxyuridin-5-bromuridin (**33**) mit Br-dU und 2'-Desoxy-4-thiouridin (**34**) mit Thio-dU bezeichnet.

4.2 Synthese des phenothiazinmodifizierten Nukleosids **25**

Die Synthese von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**25**) umfasst 3 Stufen. Zuerst wird 10-Methylphenothiazin (**35**) an der 3-Position zu **23** bromiert. Als Bromierungsreagenz wurde elementares Brom in Essigsäure^[311,312] verwendet. Dabei steht die Reaktion in Konkurrenz mit der Zweifachbromierung zu 3,7-Dibrom-10-methylphenothiazin (**36**). Die maximale Ausbeute des einfach bromierten Phenothiazins liegt demnach bei vollständigem Umsatz theoretisch bei 66 %. Die Reaktion wurde bei 5 °C durchgeführt. Sobald sich eine günstige Produktverteilung eingestellt hatte, wurde die Reaktion durch Reduktion des Broms mit wässriger Dithionitlösung abgebrochen. Bei der anschließenden chromatographischen Reinigung konnte das 3-Brom-10-methylphenothiazin (**23**) von 3,7-Dibrom-10-methylphenothiazin (**37**) getrennt werden. Je nach Reaktionsbedingungen und Reaktivitäten konnte das Produkt **23** nur zusammen mit dem Edukt **35** als Gemisch isoliert werden. Dieses Gemisch hatte aber für die nachfolgenden Reaktionen keine Bedeutung, da 10-Methylphenothiazin (**35**) im nächsten Schritt unreaktiv bleibt und danach als Nebenprodukt abgetrennt werden konnte. Anschließend wurde aus 3-Brom-10-methylphenothiazin (**23**) in einer palladiumkatalysierten Reaktion die Verbindung **24**, analog der Synthesemethode von *Miller et al.*, hergestellt.^[315] Als Palladium-Katalysator wurde PdCl₂(dppf) verwendet, da die Liganden keine schwer abzutrennende Verunreinigungen gaben (s. Abbildung 4-4).

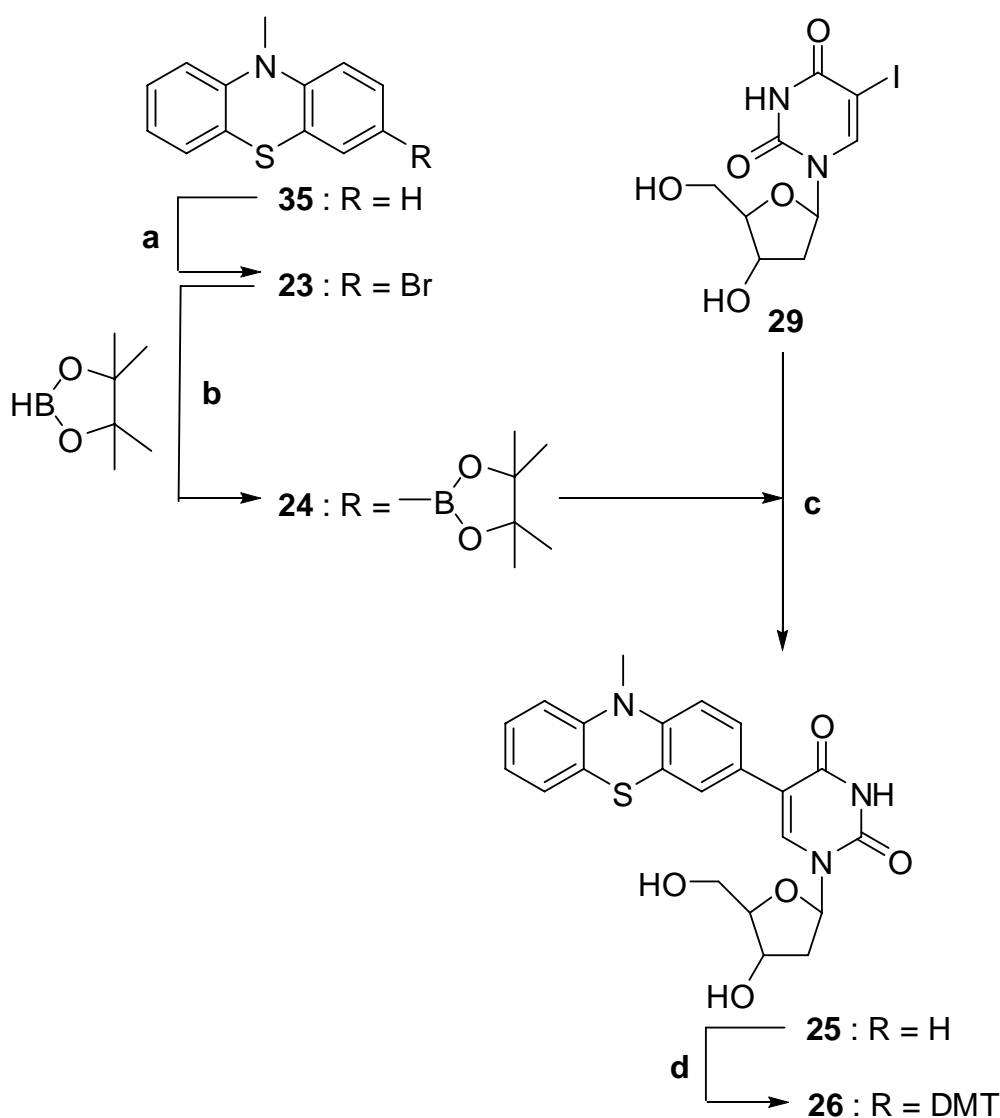


Abbildung 4-4: Syntheschema zur Darstellung des DNA Bausteins **24**; a) Br₂ (1 eq), CH₃COOH/ NaOAc/ CH₂Cl₂, 58 °C, 30 min, 67 %; b) Pinakolboran (2 eq), NEt₃ (3 eq), PdCl₂(dppf) (0.03 eq), 1,4-Dioxan, 100 °C, 16 h, 57 %; c) **24** (1.2 eq), PdCl₂(dppf) (0.1 eq), NaOH (20 eq), THF/ H₂O/ MeOH, 78 °C, 44 h, 34 %; d) DMT-Cl (2.0 eq), Pyridin, RT, 16 h, 52 %; e) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2.6 eq), NEt₃ (2.9 eq), CH₂Cl₂, RT, 45 min, 95 %.

Der Schlüsselschritt bei der Darstellung des phenothiazinmodifizierten Nukleosids **25** ist die wiederum palladiumkatalysierte Verknüpfungsreaktion zwischen Verbindung **24** und 5-Iod-2'-desoxyuridin (**29**). Diese *Suzuki-Miyaura*-Kupplung lieferte nur mäßige Ausbeuten (ca. 30 %). Als Pd-Katalysator wurde erneut das PdCl₂(dppf) verwendet, da im Gegensatz zu Tetrakis(triphenylphosphino)-palladium(0) die Wasserlöslichkeit einen entscheidenden Vorteil darstellt.

4.3 Synthese der phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierten DNA

Für den Einbau in DNA musste die 5'-OH-Gruppe des Phenothiazin-Nukleosids (**24**) mit der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe **26** und die 3'-OH-Gruppe mit der β -Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramiditgruppe versehen werden (s. Abbildung 4-5).

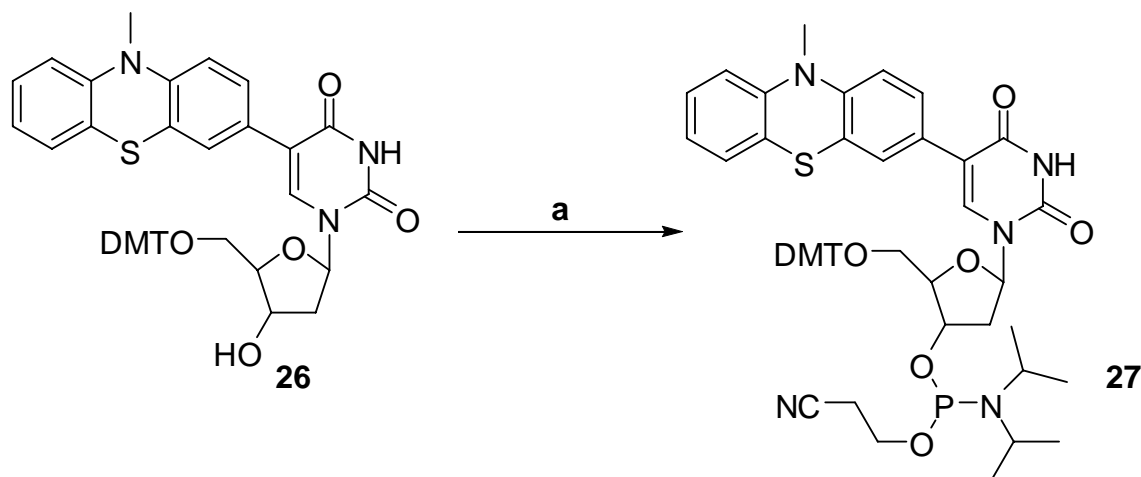


Abbildung 4-5: Darstellung des Phosphoramidits **27**; a) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2.6 eq), NEt_3 (2.9 eq), CH_2Cl_2 , RT, 45 min, 95%.

Die Thio-dU- und Br-dU-Phosphoramidite sind kommerziell erhältlich und wurden lt. Hersteller eingebaut. Das Phenothiazin-dU-phosphoramidit **27** wurde mit Hilfe eines modifizierten Kupplungsprotokolls mit einer Kupplungszeit von 15 Minuten eingebaut. Die Kupplungseffizienz wurde mit dem Tritylmonitor verfolgt (s. Abbildung 4-6). Die Abspaltung der phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierten Oligonukleotide orientierte sich an der Herstellervorschrift für die thiouridinmodifizierten Oligonukleotide. Diese erfolgte 24 h bei Raumtemperatur in conc. Ammoniaklösung in Gegenwart von 50 mM NaSH.^[316] Die Aufreinigung und Trennung der Oligonukleotide erfolgte nach Standardverfahren mit RC-HPLC. Bei der Detektion der modifizierten Oligonukleotide wurden die Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 315$ nm gewählt, die charakteristisch für das Phenothiazin-Nukleosid **24** sind.^[66, 316]

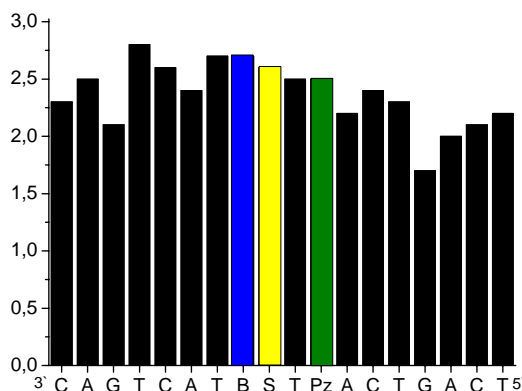


Abbildung 4-6: Tritylmonitor der erfolgreichen Synthese des **Pz2** Oligonukleotids. **B** = Brom-dU, **S** = Thio-dU, **Pz** = Pz-dU.

Für die Untersuchung des Elektronentransfers in M-DNA wurden folgende Sequenzen synthetisiert (s. Abbildung 4-7).

Pz1 5'-CAG-TCA-PzTSTBT-ACT-GAC-3'

T1 3'-GTC-AGT-AAS-AAA-TGA-CTG-5'

Pz2 5'-TCA-GTC-APzT-SBT-ACT-GAC-3'

T2 3'-AGT-CAG-TAA-SAA-TGA-CTG-5'

Pz3 5'-TCA-GTC-APzA-SBT-ACT-GAC-3'

T3 3'-AGT-CAG-TAS-AAA-TGA-CTG-5'

Pz4 5'-TCA-GTC-APzS-TBT-ACT-GAC-3'

T3 3'-AGT-CAG-TAS-AAA-TGA-CTG-5'

Abbildung 4-7: Sequenzen der phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierten Oligonukleotide. Die Bedeutung der Abkürzungen: **Pz** = Pz-dU, **S** = Thio-dU, **B** = Br-dU.

4.4 Darstellung und Charakterisierung der M-DNA

Zu den frisch hybridisierten 4 μ M Duplexen wurden 1 bzw. 2 eq M Silbernitrat-Lösung (0.01 M) titriert. Anschließend wurden die Duplexe auf spektroskopische und elektronische Eigenschaften untersucht. Bei der Duplexherstellung wurde statt der üblichen 250 mM NaCl 100 mM

Natriumacetat verwendet. Grund dafür ist, dass bei Zugabe von Silberionen die Ionenkonzentration von Silberchlorid höher wäre als das Löslichkeitsprodukt von Silberchlorid ($K_L = 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^2/\text{l}^2$). Dies würde zur Fällung von Silberchlorid führen und somit zur Verfälschung der Silberionenkonzentration (s. Abbildung 4-8). Dabei wurden folgende Metall-Basenpaare gebildet: **Thio-dU-Ag-Thio-dU-** bzw. **Thio-dU-Ag-Ag-Thio-dU-Basenpaare**. Bei dem zweiten Metallbasenpaar wird eine „Silberbrücke“ gebildet.

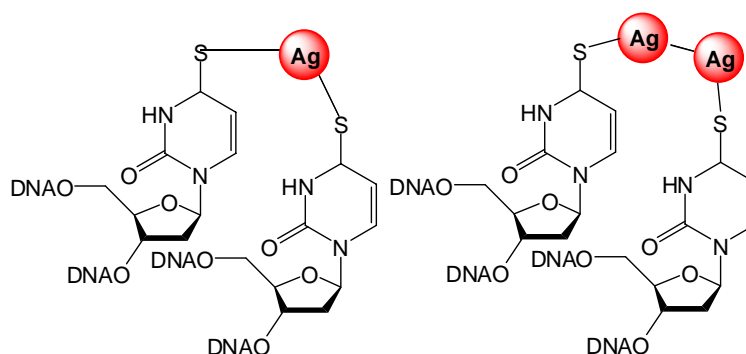


Abbildung 4-8: Darstellung der Metall-Basenpaare aus Thio-dU **34** und Silberionen; **Thio-dU-Ag-Thio-dU-** (links) bzw. **Thio-dU-Ag-Ag-Thio-dU-Basenpaare** (rechts).

Die silberhaltigen Duplexe werden mit folgender Nomenklatur bezeichnet (s. Tabelle 4-1):

Tabelle 4-1: Nomenklatur der M-Duplexe. Als Beispiel für die Bezeichnung wurde der M-Duplex **Pz1/T1** verwendet.

M-Duplexe mit 1 eq Ag	M-Duplex mit 2 eq Ag
Pz1/T1 ^{1 eq Ag}	Pz1/T1 ^{2 eq Ag}

Ag = Silberionen

Anschließend wurden die Absorptionsspektren der Duplexe **Pz1/T1**^{0-2eq Ag}-**Pz4/T3**^{0-2eq Ag} aufgenommen. Die Spektren zeigen mit der steigenden Zahl der Silberäquivalente im Wellenlängenbereich $\lambda = 260 \text{ nm}$ einen hypsochromen Effekt. Weiterhin war zu beobachten, dass die Absorptionsbande bei Wellenlänge $\lambda = 330 \text{ nm}$ von Thiouridin dominiert wurde. Diese wiederum verhält sich nach der Zugabe an Silberionen ebenfalls hypsochrom (s. Abbildung 4-9).

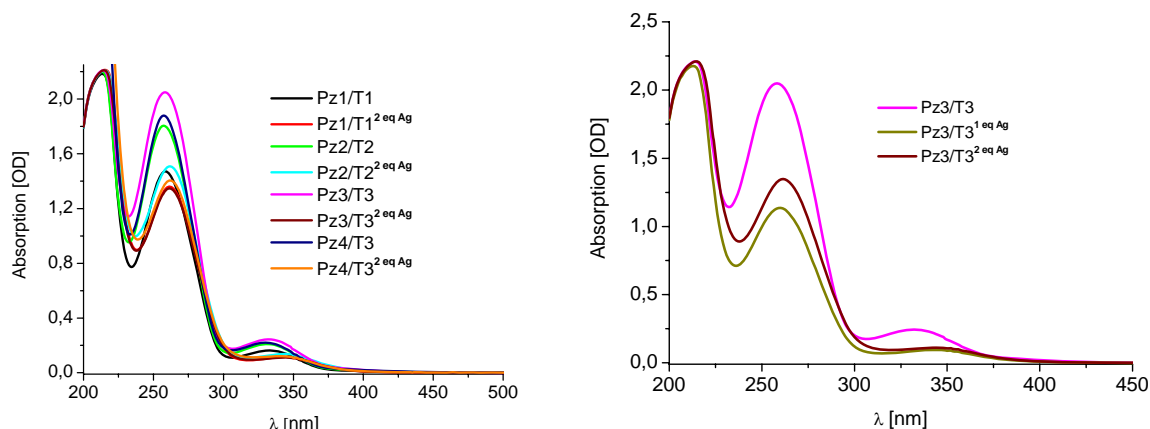


Abbildung 4-9: Die Absorptionsspektren der metallfreien Duplexe **Pz1/T1–Pz4/T3** und der metallionenhaltigen Duplexe **Pz1/T1**^{0-2 eq Ag}–**Pz4/T3**^{0-2 eq Ag}.

Die thermische Stabilität der M-DNA sollte eigentlich mit steigender Menge der vorhandenen Silberionen steigen (s. Tabelle 4-2). Diese Tendenz konnte aber nur vereinzelt beobachtet werden. Das Problem lag in der thermischen Instabilität der thiouridin-DNA-Basen und bei der Aufnahme von Schmelztemperaturen, denn statt der erwarteten sigmoidalen wurde ein linearer Absorptionsanstieg erhalten. Demnach war die Bestimmung der thermischen Stabilität nur vereinzelt möglich.

Tabelle 4-2: Die Schmelztemperatur der phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierten Oligonukleotide (4 μ M DNA in 10 mM NaP_i, pH7 und 100 mM NaOAc).

Duplex	T _m [°C]	Duplex	T _m [°C]
Pz1/T1 ^{ohne Ag}	≈ 45	Pz3/T3 ^{ohne Ag}	48
Pz1/T1 ^{1 eq Ag}	50	Pz3/T3 ^{1 eq Ag}	n. b.
Pz1/T1 ^{2 eq Ag}	≈ 65	Pz3/T3 ^{2 eq Ag}	n. b.
Pz2/T2 ^{ohne Ag}	n. b.	Pz3/T4 ^{ohne Ag}	n. b.
Pz2/T2 ^{1 eq Ag}	52	Pz3/T4 ^{1 eq Ag}	n. b.
Pz2/T2 ^{2 eq Ag}	≈ 65	Pz3/T4 ^{2 eq Ag}	n. b.

n. b. = nicht bestimmbar

4.5 Untersuchungen zum Elektronentransfer

Die Lösungen der metallionenfren Duplexe **Pz1/T1**^{0-2eqAg}–**Pz4/T3**^{0-2eqAg} und metallionenhaltigen Duplexe **Pz1/T1**^{2eqAg}–**Pz4/T3**^{2eqAg} wurden mit dem Licht einer 75 W-Xenonlampe 1 h lang bestrahlt. Für die selektive Anregung des Phenothiazin-Chromophors wurde ein Filter für $\lambda < 305$

nm verwendet.^[322] Aufgrund der Erkenntnisse aus den Vorexperimenten musste die Aufarbeitung nach der Bestrahlung der Proben, leicht modifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass Thio-dU eine thermische Instabilität oberhalb von ca. 50 °C aufweist. Entsprechend wurden in regelmäßigen Abständen Aliquots (30µl) der DNA-Lösung entnommen, mit Piperidin bei Raumtemperatur 30 Minuten behandelt und mittels HPLC analysiert. Für die Auswertung der noch vorhandenen markierten Stränge wurde als interner Standard ein unmodifiziertes 19-mer Oligonukleotid **C22** dazugegeben.^[4, 66] Man erkennt, dass die Menge der modifizierten Duplexe in beiden Bestrahlungsreihen kontinuierlich abnimmt (s. Abbildung 4-10). Die photochemische Spaltung der metallfreien Duplexe **Pz1/T1–Pz4/T3** erfolgt allerdings schneller als bei metallhaltigen Duplexe **Pz1/T1^{2eq Ag} - Pz4/T3^{2eq Ag}**. Die Spaltungsgeschwindigkeit der metallfreien DNA **Pz1/T1–Pz4/T3** ist von Anzahl und Art der Basenpaare zwischen dem Ladungsdonor Pz-dU und dem Akzeptor Br-dU weitgehend unabhängig, einzig beim Duplex **Pz1/T1** war diese am Größten. Die Abnahmegeschwindigkeit bei den metallhaltigen Duplexen **Pz1/T1^{2eq Ag}-Pz4/T3^{2eq Ag}** ist wesentlich geringer und es konnte auch eine Abhängigkeit von Anzahl der Basenpaare und metallvermittelten Basenpaare zwischen dem Donor-Akzeptor-System festgestellt werden. Der Ladungstransfer ist beim Metall-Basenpaar, das im Duplex **Pz3/T3^{2eq Ag}** gegenüber verschoben positioniert ist, wesentlich ineffizienter.

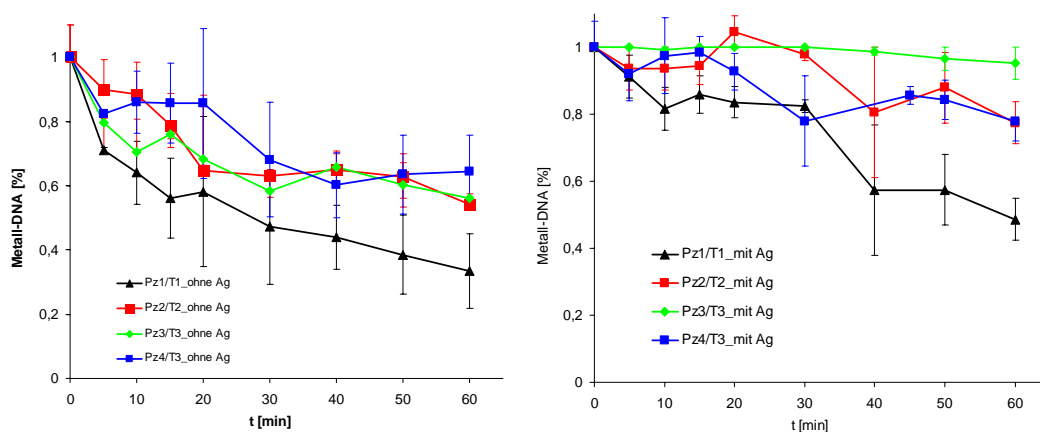


Abbildung 4-10: Bestrahlungsreihe der metallionenfreien Duplexe **Pz1/T1–Pz4/T3** und der metallionenhaltigen Duplexe **Pz1/T1^{0-2eq Ag}-Pz4/T3^{0-2eq Ag}**.

4.6 Zusammenfassung

Durch den Ersatz der kanonischen *Watson-Crick*-Basenpaare durch Liganden, zur Erzeugung von metallionenhaltigen Basenpaaren, man erhofft sich neue physikalischen Eigenschaften, wie z. B. die erhöhte thermische Stabilität oder die modulierbare Elektronentransfereffizienz im Nanobereich.

In diesem Kapitel soll die Elektronentransfereffizienz in einer metallionenhaltigen DNA photochemisch untersucht werden. Das angewandte Donor-Akzeptor-System besteht aus 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**25**) als photoinduzierbarer Ladungsdonor und 2'-Desoxyuridin-5-bromuridin (**33**) als chemischer Ladungsakzeptor. Die Ladungstransfer-effizienz wurde mittels HPLC analysiert. Bekannt war bereits, dass es mit diesem Donor-Akzeptor-System möglich ist, die Distanz- und die Sequenzabhängigkeit des Elektronentransfers zu untersuchen. Als metallvermittelte DNA-Base wurde Thio-dU verwendet, das selektiv einwertige Metallionen, wie Silber, chelatisiert und somit zusammen ein Metall-Basenpaar bilden können. Diese metallvermittelten Basen standen sich demnach im Duplex direkt gegenüber oder waren um ein Basenpaar versetzt platziert. Die Silberionen wurden durch Titration zugegeben, da somit die Konzentration des Silbers gesteuert werden konnte. Abhängig von der Zugabe von 1 eq oder 2 eq an Silberionen, bildete sich demnach ein **Thio-dU-Ag-Thio-dU**- oder **Thio-dU-Ag-Ag-Thio-dU**-Basenpaar. Die Effizienz des Ladungstransfers wurde durch Bestrahlungsexperimente ermittelt. Es wurde festgestellt, dass die Ladungstransfereffizienz in metallfreien Duplexen **Pz1/T1-Pz4/T3** im Vergleich zu metallionenhaltigen Duplexen **Pz1/T1^{2eqAg}-Pz4/T3^{2eqAg}** deutlich schneller (s. Abbildung 4-10) ist. Bei den metallhaltigen Duplexen **Pz1/T1^{2eqAg}-Pz4/T3^{2eqAg}** wurde eine Sequenzabhängigkeit festgestellt. Der Ladungstransfer ist beim **Pz3/T3^{2eqAg}** Duplex etwas uneffizienter als in den anderen metallhaltigen Duplexen. Offensichtlich unterbricht das diagonale metallionenhaltige Basenpaar den Ladungstransfer am effizientesten. Ein direkter Vergleich mit bereits publizierten phenothiazin- und bromuridinmodifizierten Duplexen konnte aufgrund der veränderten Durchführung des Experimentes nicht erfolgen.

Die UV/Vis-Untersuchungen an allen Duplexen **Pz1/T1^{0-2 eq Ag}-Pz4/T3^{0-2 eq Ag}** ergaben eine typische Absorptionsbande im Thio-dU Bereich ($\lambda = 330$ nm), die mit steigender Konzentration an Silberionen deutlich abnahm.

Jedoch konnte bei diesem Ansatz auch ein entscheidender Nachteil des Thio-dU **34** als metallvermittelte Base festgestellt werden. Aufgrund der thermischen Instabilität und einer Photolyse ab einer Wellenlänge von $\lambda > 330$ nm eignet sich Thio-dU **34** als metallvermittelte Base für die metallionenhaltige DNA in Elektronentransferexperimenten nur bedingt.^[321]

5. Entwicklung neuer DNA-basierter Fluoreszenzsonden

Für die Untersuchung der photophysikalischen Wechselwirkungen von Chromophoren, eignen sich am besten Farbstoffe mit ausgeprägtem π -System. Eine breite Anwendung finden die Pyrenchromophore, die als sog. pyrenmodifizierte Nukleoside auf verschiedenster Weise in die DNA eingebaut werden.^[3, 4, 53, 65, 81, 256-263] Auch in unserer Arbeitsgruppe werden pyrenmodifizierte Nukleoside synthetisiert und in DNA eingebaut.^[4, 53, 64, 65, 193, 227, 256, 265] Die Vorteile des Pyrenrestes liegen auf der Hand. Neben der selektiven Anregung des Chromophors fungieren die Pyrene aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften als modulierbare Fluoreszenzsonden.^[264, 265]

In dieser Arbeit wurde 5'-(1-Ethynylpyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py \equiv -dU, **28**) synthetisiert^[81] (s. Abbildung 5-1) und nebeneinander in unterschiedlicher Anzahl in DNA eingebaut. Diese mehrfach modifizierten Py \equiv -dU-Oligonukleotide (**Py2/C1-Py5/C1**, **Py5/C1-Py5/C4** und **Py5/Py5'**) wurden mit der stationären optischen Spektroskopie untersucht, charakterisiert und mit dem einfach pyrenethinylmodifizierten Oligonukleotid **Py1/C1** verglichen. Mit der zeitaufgelösten transienten Absorption wurde die elektronische Kopplung zwischen dem Chromophor und der DNA untersucht. Als Verknüpfungseinheit im Py \equiv -dU Nukleosid **28**, zwischen Chromophor und DNA-Base, fungiert eine Ethinyl-Gruppe. Diese konformationell steife Gruppe gewährleistet eine starke elektronische Kopplung und verhindert so die Ausbildung eines vollständig ladungsgetrennten Zustandes. Eine weitere Funktion der Ethinyl-Gruppe ist die Platzierung der Pyren-Gruppen außerhalb der großen Furche, so können diese aufgrund der koplanaren Anordnung eine photophysikalische Wechselwirkung untereinander eingehen.

Anzumerken wäre, dass die Py \equiv -dU Oligonukleotide, die für die zeitaufgelösten Messungen verwendet wurden, sich in der Sequenz geringfügig unterscheiden und keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Es handelt sich um ein einfach und zwei zweifach Py \equiv -dU-modifizierte Oligonukleotide. Diese drei modifizierten Einzelstränge werden wie folgt bezeichnet: **Py1'**, **Py2'** und **Py2''**. Dessen Gegenstränge sind: **C1'**, **C2'** und **C2''**. Eine größere Abweichung in der Sequenz zum **Py2** stellt das **Py2''**-modifizierte Oligonukleotid dar. Beim **Py2''** Einzelstrang ist zwischen den beiden Py \equiv -dU-Einheiten ein Adenin vorhanden. Diese Base soll die Chromophor-Chromophor-Wechselwirkung schwächen (s. Abbildung 5-1).

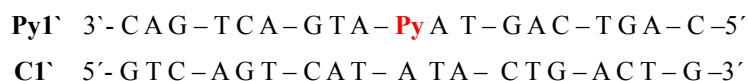
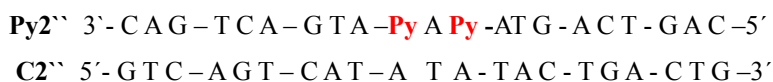
Einfach Py-dU-modifizierter Duplex**Zweifach Py-dU-modifizierte Duplexe**

Abbildung 5-1: Alternative Py-≡dU-modifizierte Duplexe (Py1'/C1', Py2'/C2' und Py2''/C2'') für die zeitaufgelösten Messungen.

Abschließend (Kapitel 5.5), sollen die Ergebnisse der Py-≡dU-modifizierten Oligonukleotide mit den aus der Literatur bekannten, mit 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin (bezeichnet als Py-dU) funktionalisierten Oligonukleotide (Py-dU-modifizierten Oligonukleotide)^[228] verglichen werden (s. Abbildung 5-2).

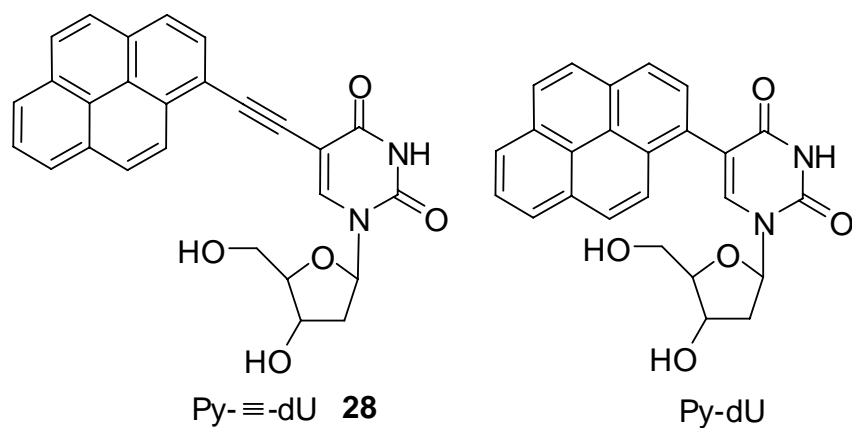


Abbildung 5-2: 5'-(1-Ethynylpyrenyl)-2'-desoxyuridin (Py-≡dU, **28**) und 5-(Pyren-1-yl)-2'-desoxyuridin (Py-dU) als Fluoreszenzsonden.

Die Sequenzen der Py-dU Duplexe sind identisch zu den **Py1/C1-Py5/C1** und **Py5/C2-Py5/C4** Duplexen und werden wie folgt bezeichnet (s. Abbildung 5-3).

Modifiziertes Nukleotid	Richtig gepaarte Duplexe	Fehlgepaarte Duplexe
Py-≡-dU-Einheit	Py1/C1-Py5/C1	Py-dU1/C1-Py-dU5/C1
Py-dU-Einheit	Py1/C2-Py5/C4	Py-dU1/C2-Py-dU5/C4

Abbildung 5-3: Bezeichnung der vergleichbaren Py-dU Duplexe.

Die Oligonukleotide werden seit längerem als Matrize für den Einbau von Multichromphorstapel (*chromophore-zipper array*) benutzt.^[69, 71, 216, 225, 229-231, 256, 309] Mit dem Mehrfacheinbau erhofft man sich, z.B. durch die bessere oder gezielte Übertragung der Anregungsenergie und/oder Ladung, neue Materialien (*Nanodevice*) mit spezifischen Eigenschaften zu entwickeln.^[229] Die entscheidende Frage bei den Multichromphorstapel ist, ob sich ein mehrfach modifiziertes Oligonukleotid noch selbstkomplementär verhält und somit ein Potential für die Anwendung in der Fluoreszenz-Analytik aufweist.

5.1 Synthese des Pyrenylethynyl-Phosphoramidits **31** und dessen Oligonukleotide

Die Darstellung von 2'-Desoxy-5-(1-pyrenylethynyl)-uridin (Py-≡-dU, **28**) erfolgte aus kommerziell erworbenem 5-Iod-2'-desoxyuridin (**29**) und 1-Ethynylpyren (**30**). Für die C-C-Verknüpfung wurde die Sonogashira-Kupplung gewählt.^[81] Als Katalysator wurde PdCl₂(dppf)₂ in Kombination mit Cu(I)-iodid eingesetzt. Um Py-≡-dU **28** als DNA-Baustein in der automatischen Festphasensynthese einzusetzen, muss die primäre 5'-OH-Gruppe zuerst mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl) zu **31** versetzt und die 3'-OH-Gruppe mit der 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramiditgruppe zu **32** modifiziert werden. Die Gesamtausbeute dieser dreistufigen Synthese beträgt 28 % (s. Abbildung 5-4).

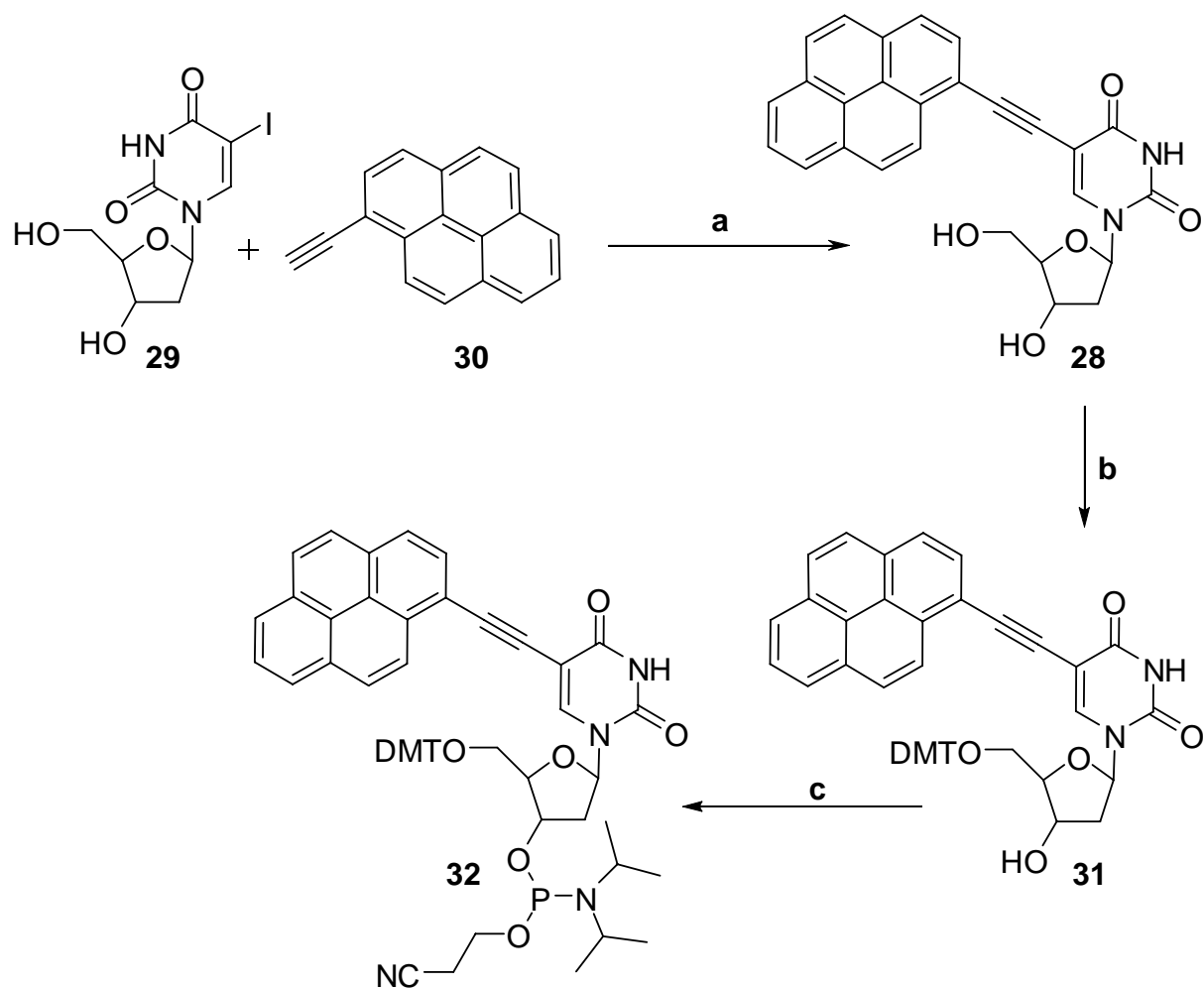


Abbildung 5-4: Synthese des Pyrenethinyl-Phosphoramidits **32**. Die Reaktion erfolgte in drei Stufen; a) **30** (1 eq), DMF, RT, 16 h, PdCl₂(dppf) (0.1 eq), CuI (0.1 eq.), NEt₃ (3 eq), 60 %; b) DMT-Cl (1.2 eq), Piperidin, RT, 16 h, anschließend MeOH, 0 °C, 1 h, 90 %; c) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1.3 eq), NEt₃ (4 eq), DCM, RT, 45 Min., 95 %.

Das Phosphoramidit **32** wurde mit Hilfe eines modifizierten Kupplungsprotokolls sowohl beim Einfach- als auch beim Mehrfacheinbau mit einer Kupplungszeit von 15 Minuten verwendet. Die Kupplungseffizienz wurde mit dem Tritylmonitor verfolgt (s. Abbildung 5-5).

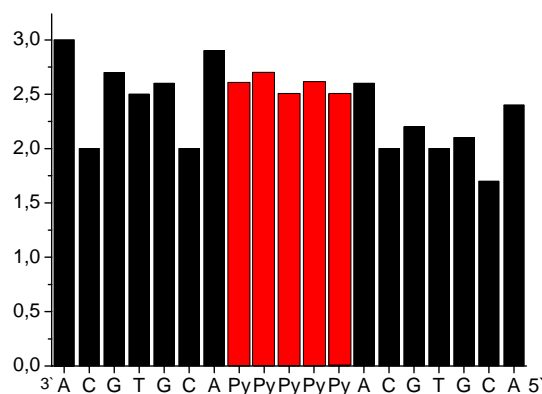
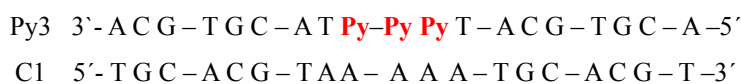
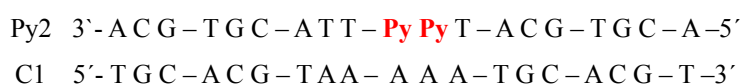


Abbildung 5-5: Tritylmonitor der Synthese von fünffach Py≡dU-modifizierter DNA **Py5**.

Die Abspaltung und Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide erfolgt wie bei den unmodifizierten Strängen. Bei der Detektion der modifizierten Oligonukleotide wurden die Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und 340 nm gewählt. Die massenspektroskopische Untersuchung mittels MALDI-TOF belegte den erfolgreichen Einbau der Py≡dU Einheiten in die Oligonukleotide (**Py1-5**).

5.2 Ein- bis fünffach Py≡dU-modifizierte Oligonukleotide

Um das spektroskopische Verhalten der pyrenhaltigen Multichromophore in DNA zu studieren, wurden die ein- bis fünffach-modifizierten Oligonukleotide **Py1-5** synthetisiert (s. Abbildung 5-4). Die Untersuchung der optischen Eigenschaften erfolgte sowohl an den Einzelsträngen **Py1-5** als auch an den Duplexen **Py1/C1-Py5/C1**. Als Gegenstrang diente dabei das unmodifizierte Oligonukleotid **C1** (s. Abbildung 5-6), das Adenin als komplementäre Base zur Py≡dU Modifikation enthielt.



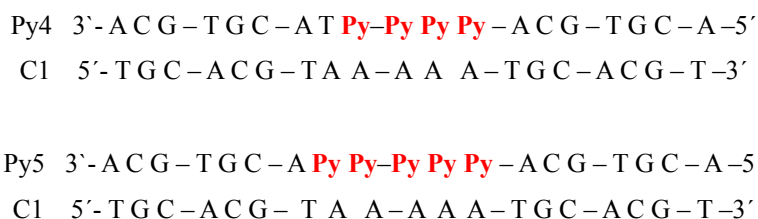


Abbildung 5-6: Sequenzen von Py≡dU Duplexen (**Py1-5'**/C1). Als Gegenbase zu den modifizierten Uridin-Einheiten wurde Adenin eingebaut.

Die Absorptionsspektren von **Py1-5** zeigen die typischen Eigenschaften des DNA-Pyrensystems (s. [Abbildung 5-7 links](#)). Im Pyrenbereich sind deutlich zwei breite Absorptionsmaxima ($\lambda = 375$ nm und 400 nm) zu erkennen und bei steigender Anzahl der Pyrenchromophore eine Rotverschiebung um $\lambda = 5$ nm. Der Grund für die Rotverschiebung ist die excitonische Wechselwirkung der Chromophore untereinander. Weiterhin ist zu beobachten, dass die optische Dichte (OD) der Einzelstränge im Pyrenbereich mit steigender Anzahl der Py≡dU Einheiten einen linearen hyperchromen Effekt zeigt (s. [Abbildung 5-7](#)). Somit lässt sich sagen, dass die Pyren-Chromophore im Einzelstrang keinen Einfluss aufeinander ausüben. Sie verhalten sich annähernd wie fünf einzelne Py≡dU Einheiten.

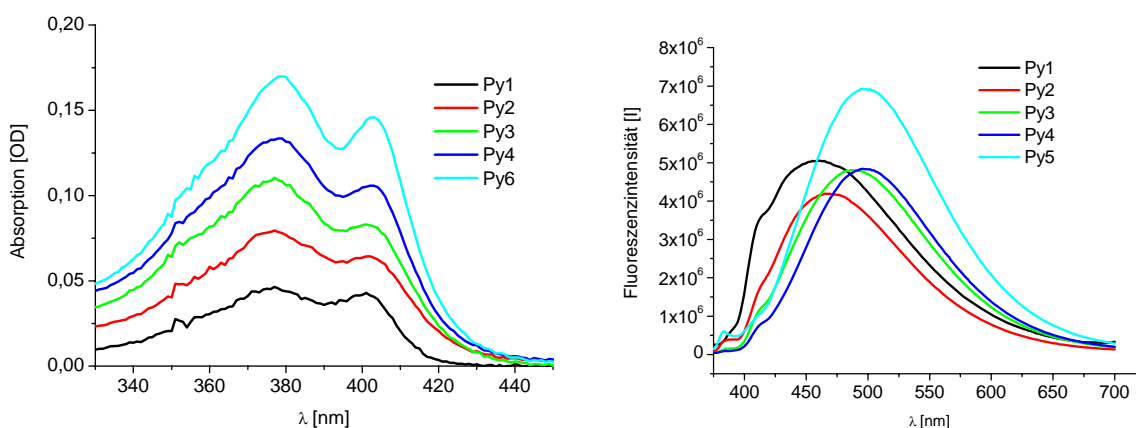


Abbildung 5-7: Absorptions- und Emissionsspektren von 2.5 µM (**Py1-5**) DNA in 10 mM NaPi, pH 7.

Die Emission der Einzelstränge wurde bei den Anregungswellenlängen von $\lambda = 375$ nm und 400 nm gemessen (s. [Abbildung 5-7 rechts](#)). Sie zeigen die typischen strukturlosen Emissionen eines Exciplexes, die mit steigender Anzahl der Py≡dU Einheiten leicht rotverschoben sind. Bemerkenswerterweise zeigen die Emissionsmaxima der Einzelstränge **Py1-Py4** eine einheitliche Fluoreszenzintensität trotz ansteigender Anzahl der Py≡dU Einheiten.

Die Absorptionsspektren der modifizierten Duplexe **Py1/C1-Py5/C1** (s. Abbildung 5-8 *oben*) zeigen im Pyrenbereich die typischen zwei Absorptionsbanden ($\lambda = 380$ nm und 400 nm). Diese werden mit steigender Anzahl der Chromophore ebenfalls leicht rotverschoben (ca. 5 nm). Die Absorptionsbande bei $\lambda = 375$ nm kommt durch die Grundzustandswechselwirkung zwischen der Ethinylbrücke der Py≡dU-Einheit und der DNA-Base in 5'-Richtung zustande, sowie die Absorptionsbande bei $\lambda = 400$ nm durch die Grundzustandswechselwirkung der Pyren-Einheiten untereinander (s. Abbildung 5-8 *unten*).

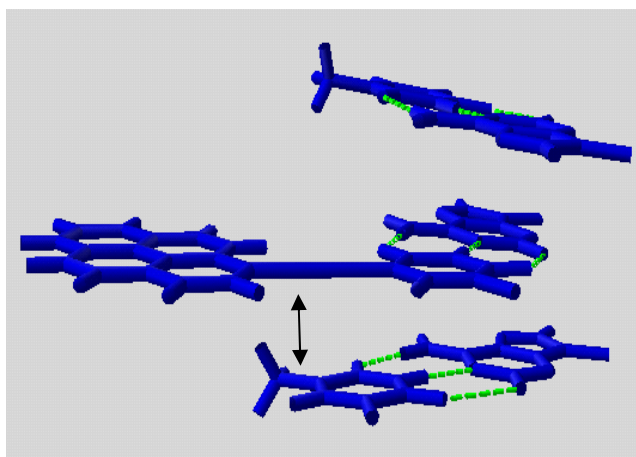
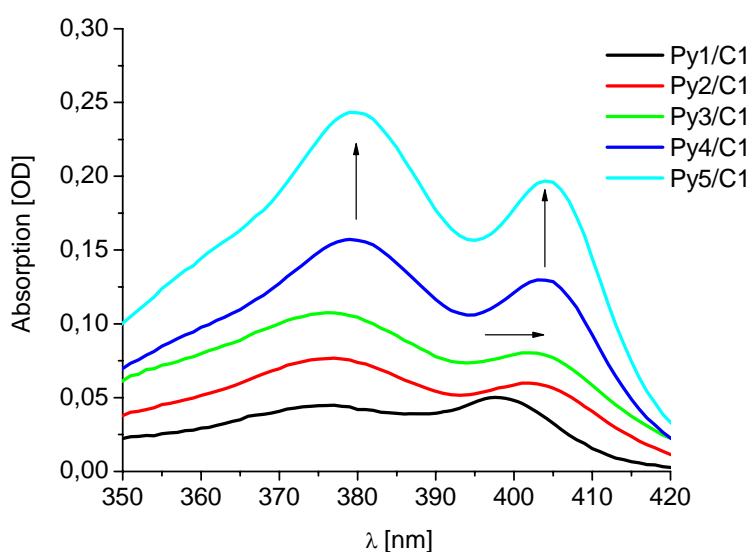


Abbildung 5-8: *Oben:* Absorptionsspektren von **Py1-5/C1**. Die Proben enthalten 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i, pH 7. *Unten:* Schematische Darstellung der Grundzustandswechselwirkung zwischen der Py≡dU-Einheit und der DNA-Base in 5'-Richtung in einem Py≡dU-modifizierten Oligonukleotid.

Bei den **Py4-5/C1** Duplexen ist, im Vergleich zu den Einzelsträngen, ein nichtlinearer hyperchromer Effekt zu beobachten (s. Abbildung 5-9). Denn bei diesen mehrfach-modifizierten Oligonukleotiden steigt die Absorption im Wellenlängenbereich $\lambda = 400$ nm durch die steigende

Anzahl der Pyreneinheiten ab vier Chromophore nicht mehr linear, sondern stärker an.

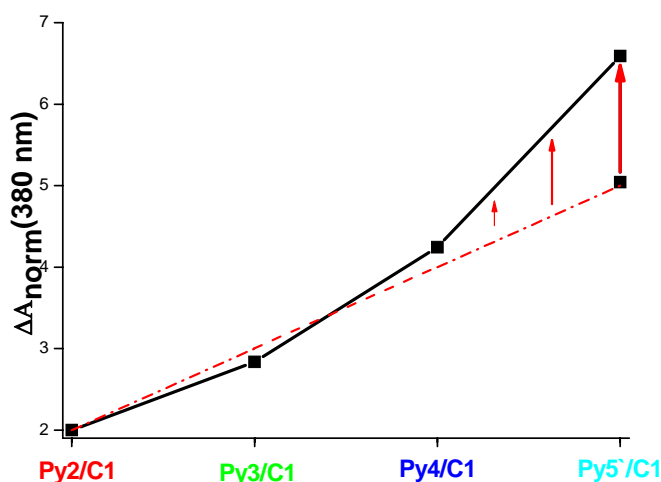


Abbildung 5-9: Ein nichtlinearer hyperchrome Effekt der Duplexe **Py1-5/C1** (schwarze Linie) im Vergleich zur Einzelsträngen **Py1-Py5** (rote Linie) bei $\lambda = 380 \text{ nm}$. Die Proben enthalten $2.5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaPi , pH 7.

Dieser verstärkte hyperchrome Effekt bei $\lambda = 400 \text{ nm}$, der durch Grundzustands-wechselwirkungen der Pyreneinheiten untereinander verursacht wird, kann durch die thermische Dehybridisierung unterbrochen werden. Dies konnte mittels temperaturabhängiger UV/Vis- Spektren am **Py5/C1** Duplex gezeigt werden (s. Abbildung 5-10). Ab 70°C erkennt man einen deutlichen Rückgang der Rotverschiebung mit gleichzeitiger Absorptionsabnahme der beiden Absorptionsmaxima, insbesondere im Wellenlängenbereich bei $\lambda = 400 \text{ nm}$. Mit steigender Temperatur überwiegt das Abbild des Einzelstranges, das zur Aufhebung der Pyren-Wechselwirkung führt.

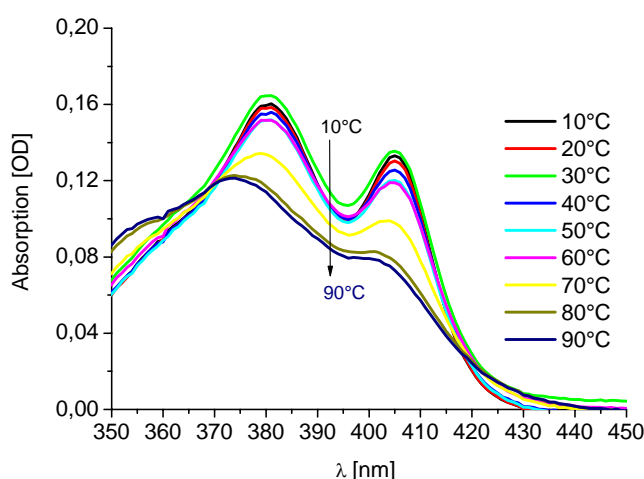


Abbildung 5-10: Temperaturabhängiges UV/Vis Spektrum von **Py5/C1**. Die Proben enthalten $2.5 \mu\text{M}$ DNA in 10 mM NaPi , pH 7.

Die Fluoreszenzspektren der mehrfach modifizierten Duplexe **Py2-5/C1** bestätigen die Grundzustandswechselwirkungen zwischen der Ethinylbrücke in der Py≡dU-Einheit und der Nukleobase in 5'-Richtung, sowie die Wechselwirkung der Pyren-Chromophore untereinander (s. Abbildung 5-11). Dies kann durch die Zunahme der Fluoreszenzintensitäten, bei steigender Anzahl der Py≡dU-Einheiten, beobachtet werden. Interessanterweise gilt das nicht für den **Py1/C1** Duplex. Dieser Fluoreszenzunterschied könnte durch den strukturellen Effekt der benachbarten Basen verursacht worden sein.

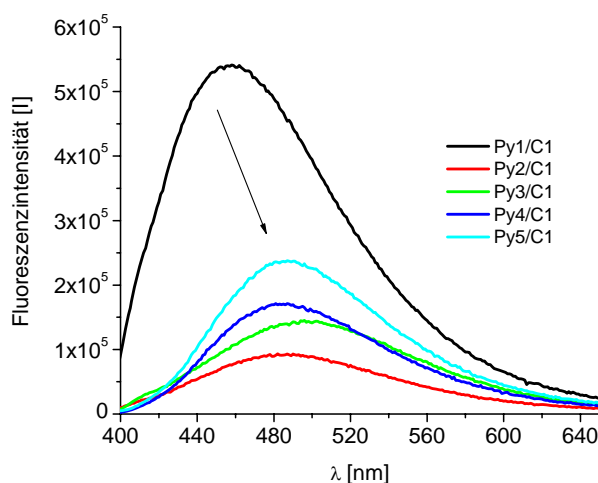


Abbildung 5-11: Fluoreszenzspektren von ein-, zwei- bis fünffach-modifizierten (**Py1/C1-Py5/C1**) Oligonukleotiden. Der Duplex enthält 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH7).

Die Schmelztemperatur der Duplexe **Py2/C1-Py4/C1** zeigen, im Vergleich zum nichtmodifizierten Duplex (61°C), eine geringfügig höhere Stabilität (s. Tabelle 5-1).^[228] Diese beträgt zwischen 4 °C bis 6 °C trotz steigender Anzahl der Py≡dU Modifikationen. Dies ändert sich jedoch beim **Py5/C1** Duplex. Die Schmelztemperatur steigt auf 76 °C und ist damit deutlich stabiler. Diese zusätzliche Stabilität resultiert aus den hydrophoben π -Wechselwirkungen der Py≡dU-Einheiten untereinander, die schon bei den Absorptionsspektren beobachtet worden sind.

Tabelle 5-1: Die Schmelztemperatur der **Py1-5/C1** Duplexe (2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i , pH 7 und 250 mM NaCl).

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C] ^b
Py1/C1	65 (61) ^a	+4
Py2/C1	66	+5
Py3/C1	65	+4
Py4/C1	67	+6
Py5/C1	76	+15

a = Die Schmelztemperatur des unmodifizierten Duplexes beträgt 61°C ^[228], **b** = Differenz aus unmodifizierten und pyrenmodifizierten Duplex.

Die CD-Spektren von **Py1/C1-Py5/C1** werden von den Signalen der B-DNA dominiert (s. Abbildung 5-12). Bei den Duplexen **Py3/C1-Py5/C1** nimmt im 1-Ethynylpyrenbereich das excitonische Signal sichtbar zu. Der Anstieg des Signals wird ab vier Py \equiv -dU Modifikationen besonders deutlich. Dieses resultiert aus der Wechselwirkung der Chromophore untereinander und wird als *Exciton Coupling* bezeichnet.^[235-240, 266] Der stärkste Effekt der Chromophorwechselwirkung wird beim **Py5/C1** Duplex beobachtet. Das CD-Spektrum zeigt zwischen 360 nm und 400 nm einen S-förmigen Kurvenverlauf der typischerweise beim sog. *Split Coupling Exciton (split CE)* auftritt.^[266]

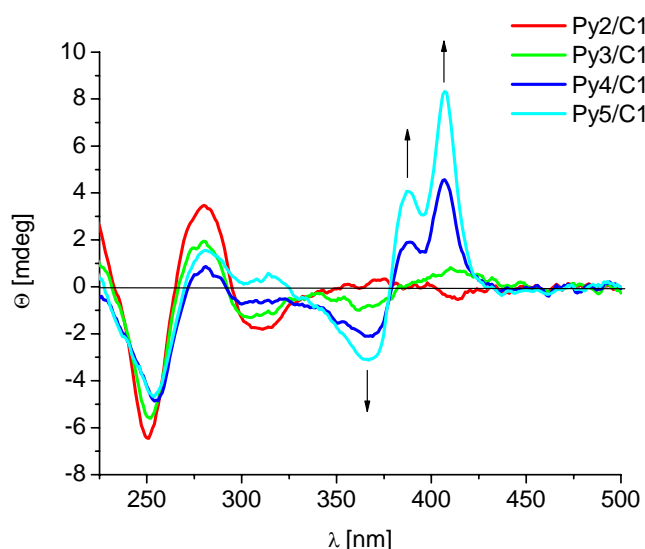


Abbildung 5-12: CD-Spektren von **Py2-5/C1**. Die Proben enthalten 2.5 μ M DNA in 10 mM NaPi und 250 mM NaCl bei pH 7.

Die Existenz der Grundzustandswechselwirkungen der Py \equiv -dU-Gruppen konnten auch mittels temperaturabhängiger CD-Spektroskopie bestätigt werden (s. Abbildung 5-13). Die CD-Signale des Duplexes **Py5/C1** zwischen $\lambda = 330$ nm und 430 nm gehen ab 70 °C, also bei Temperaturen im Bereich der Schmelztemperatur ($T_m = 76$ °C), deutlich zurück und zeigen die Eigenschaften des Einzelstranges **Py5** auf.

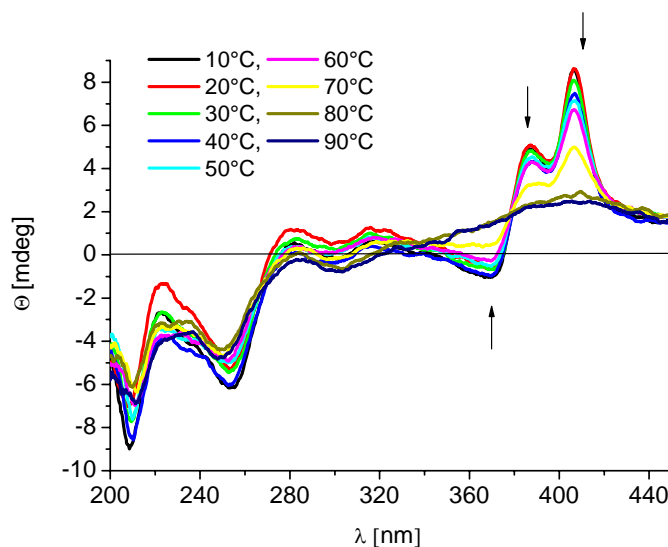


Abbildung 5-13: Temperaturabhängiges CD-Spektrum eines **Py5/C1** Duplex (2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i (pH7) und 250 mM NaCl).

Für die Untersuchung der elektronischen Kopplungen wurden in der Arbeitsgruppe *Fiebig* die zeitaufgelösten transienten Absorptionen durchgeführt.^[322] Vermessen wurde das Py- \equiv -dU Nukleosid (**28**) und drei Py- \equiv -dU-modifizierte Oligonukleotide (**Py1'/C1'**, **Py2'/C2'** und **Py2''/C2''**) (s. Abbildung 5-1 und -14).

Die zeitaufgelösten Messungen der transienten Absorption von **28** und **Py1'/C1'** zeigen nach Anregung eine ähnlich breite asymmetrische Absorptionsbande mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 700 nm. Beide zeitaufgelösten *Pump-Probe*-Spektren zeigen im Bereich von 1 ps (blau) bis 1 ns (rot) nach der Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 364$ nm) eine geringe Blauverschiebung. Diese Blauverschiebung resultiert aus Wechselwirkung der angeregten Pyren-Chromophore in DNA mit der Lösungsumgebung. Konkret heißt das, dass durch Wasserstoffbrücken der Exciplex-Zustand des photoangeregten Py- \equiv -dU-Chromophors stabilisiert wird.

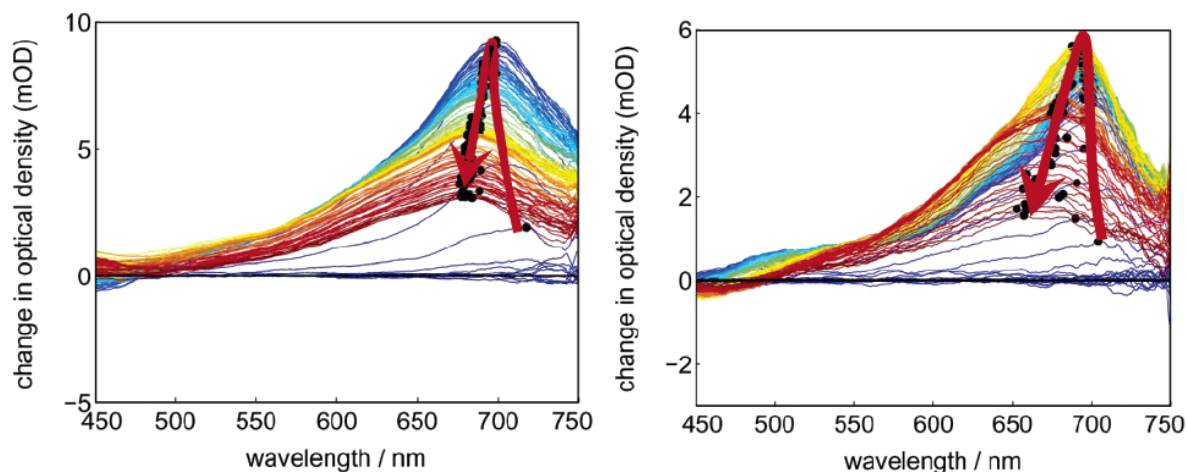


Abbildung 5-14: Zeitaufgelöste Absorptionsspektren von Py≡-dU **28** in Methanol (*links*) und Py1'/C1' in 10 mM NaPi, 250 mM NaCl und pH 7 (*rechts*). Die zeitaufgelösten Pump-Probe-Spektren von 1 ps (blau) bis 1 ns (rot) nach der Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 364$ nm).

Die Spektren der zeitaufgelösten transienten Absorption der Duplexe Py2'/C2' und Py2''/C2'' zeigen zwischen 1 ps und 1 ns nach Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 364$ nm) eine ähnlich breite asymmetrische Absorptionsbande mit Absorptionsmaximum bei ca. 700 nm.

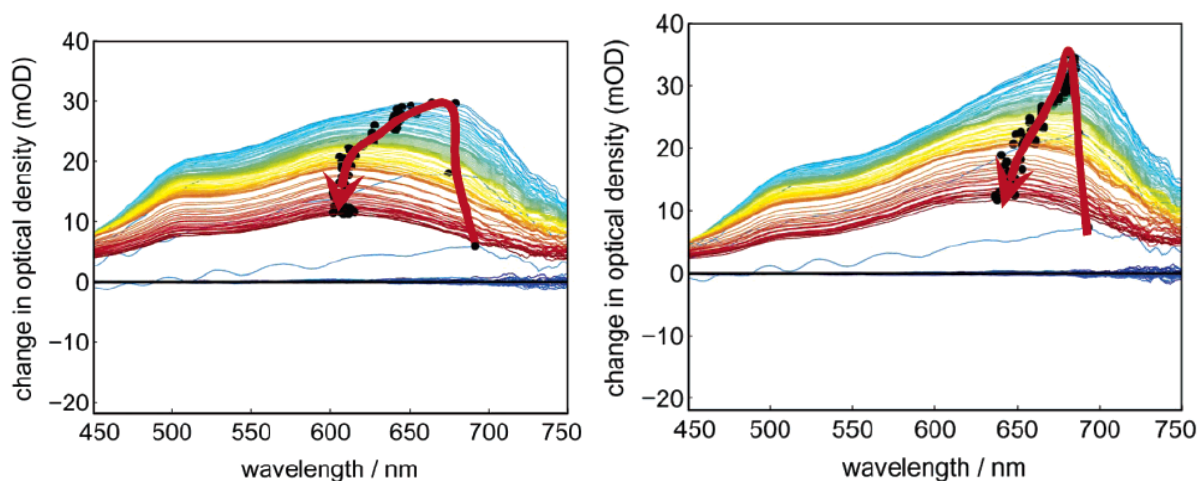


Abbildung 5-15: Zeitaufgelöste Absorptionsspektren von Py2'/C2' (*links*) und Py2''/C2'' in 10 mM NaPi, 250 mM NaCl und pH 7 (*rechts*). Die zeitaufgelösten Pump-Probe-Spektren dargestellt von 1 ps bis 1 ns nach der Anregung ($\lambda_{\text{exc}} = 364$ nm).

Wesentliche Unterschiede, im Vergleich zu **28** und Py1'/C1', sind zum einen bei 500 nm eine neue zusätzliche Absorptionsbande und zum anderen eine größere Blauverschiebung (s. Abbildung 5-15). Die Absorptionsbande bei $\lambda = 500$ nm erklärt die elektronische Kopplung zwischen den Pyren-Chromophoren, die über die DNA-Basen (*Through-Base*) verlaufen. Erwartungsgemäß ist die Blauverschiebung beim Py2'/C2' Duplex am größten. Diese „räumliche“ elektronische Kopplung (*Through-Space*) entsteht durch die Pyren-Pyren- Wechselwirkung untereinander.

Interessanterweise beobachtet man solche Pyren-Chromophor-Wechselwirkungen auch beim **Py2''/C2''** Duplex, obwohl die Chromophore durch eine Base getrennt sind. Das heißt, dass die Pyren-Pyren-Wechselwirkung derart stark ist, dass die DNA dadurch leicht geknickt wird (s. Abbildung 5-16). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass diese „räumliche“ elektronische Kopplung beim Duplex **Py2'/C2** bereits nach 10 ps vorhanden war, im Gegensatz zum **Py2''/C2''** Duplex erst nach ca. 2 ns.

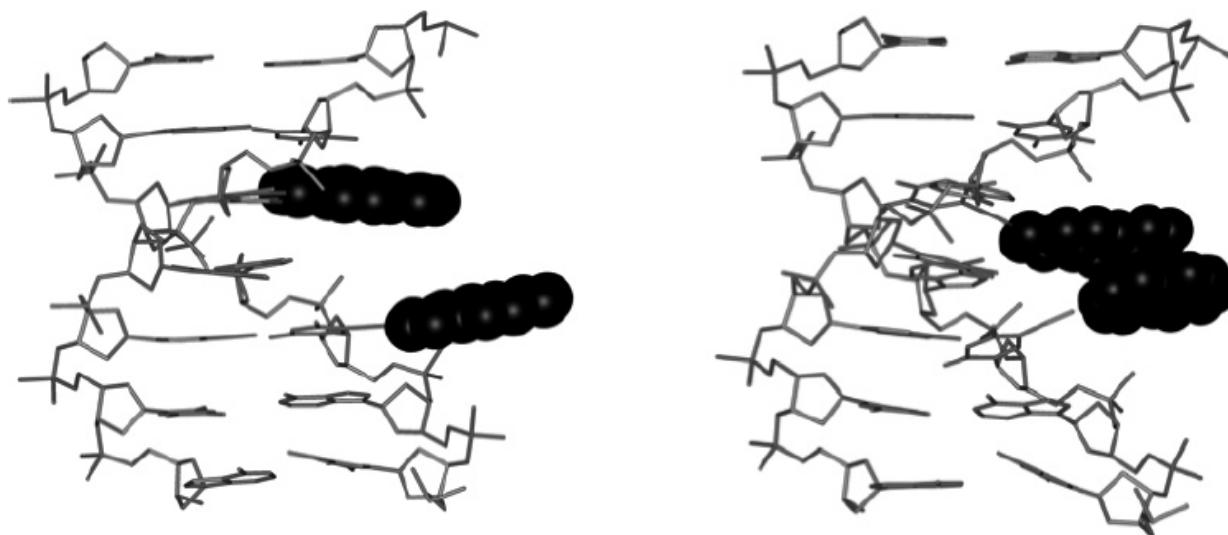


Abbildung 5-16: Dynamik des **Py2''/C2''** Duplexes vor (*links*) und nach (*rechts*) der Photoanregung.

5.3 Fehlgepaarte Duplexe mit fünffach Py-≡-dU-modifizierten Oligonukleotiden

Anhand der bereits diskutierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es mit den Py-≡-dU-modifizierten Oligonukleotiden möglich ist, durch optische Spektroskopie, dynamische Strukturänderungen zu verfolgen. Ideal wäre es, wenn dieser Multichromophorstapel mit seiner Fluoreszenzeigenschaften in der Analytik angewandt werden könnte. In diesem Fall hätte man eine empfindliche Fluoreszenzsonde, die auf Basenfehlpaarungen im Bereich des Multichromophorstapels reagieren würde.

Aus diesem Grund wurden zu **Py5** nicht nur der komplementäre Gegenstrang **C1** synthetisiert, sondern auch drei Gegenstränge **C2-4**, die im Pyrenbereich mit einer, zwei oder fünf Basenfehlpaarungen versehen sind. Als Gegenbase wurde statt Adenin, die isosterische Base Guanin verwendet (s. Abbildung 5-17).

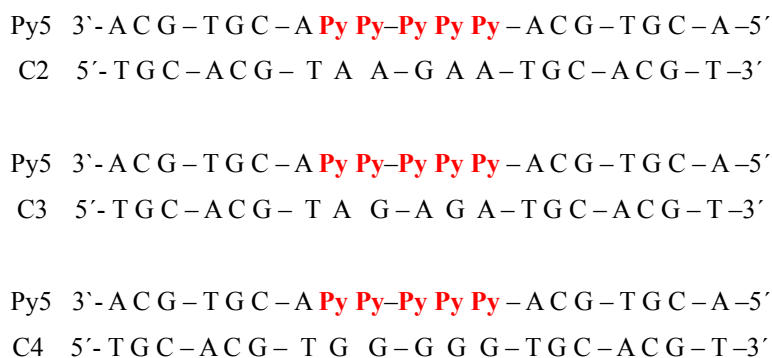


Abbildung 5-17: Sequenzen der fehlgepaarten Py≡-dU Duplexe (**Py5/C2-Py5/C4**). Als fehlende Gegenbase zu der modifizierten Uridin-Einheit wurde für Adenin die isosterische Base Guanin verwendet.

Diese drei Gegenstränge **C2-4** wurden mit **Py5** hybridisiert und durch optische Spektroskopie charakterisiert. Die Ergebnisse wurden anschließend mit dem vollkomplementären Duplex **Py5/C1** verglichen.

Im Vergleich zum richtig gepaarten Duplex **Py5/C1** zeigen die Absorptionsspektren (s. Abbildung 5-18 *links*) der fehlgepaarten Duplexe **Py5/C2-Py5/C4** im Pyrenbereich einen linearen Effekt. Dieses Ergebnis zeigt, dass bereits eine Fehlpaarung genügt, die Grundzustandswechselwirkung der Py≡-dU Anordnung im **Py/C1** signifikant zu unterbrechen. Interessanterweise zeigen alle drei fehlgepaarten Duplexe **Py5/C2-Py5/C4** nahezu gleiche Absorptionen. Somit kann man durch die UV/Vis-Spektroskopie nur einen Hinweis auf eine Basenfehlpaarung erhalten werden.

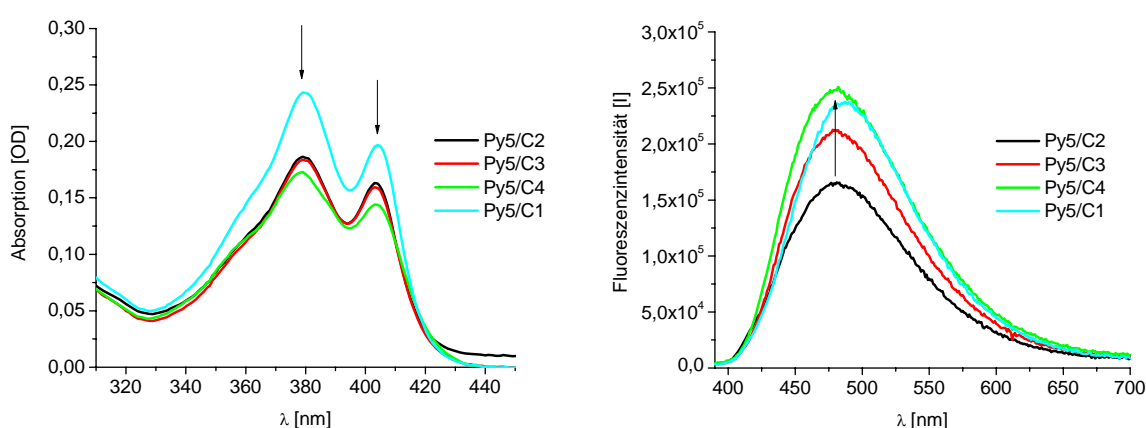


Abbildung 5-18: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **Py5/C2-Py5/C4** im Vergleich zu **Py5/C1** Duplex. Die Duplexe enthielten 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i , pH 7.

Der Einbau einer fehlgepaarten Base führt zu einem starken Fluoreszenzrückgang (s. Abbildung 5-18 *rechts*). Diese Abnahme lässt sich durch eine gestörte Anordnung der Py≡-dU-Einheiten

erklären. Interessanterweise steigt die Emission bei einer weiteren Basenfehlpaarung wieder. So zeigt der Duplex **Py5/C4** sogar eine größere Emissionsintensität, als der **Py5/C1** Duplex. Ein ähnlicher Trend konnte auch bei den Schmelztemperaturen beobachtet werden. Bei fehlgepaarten Duplexen können folgende Rückschlüsse gezogen werden. Der Duplex **Py5/C2** reagiert empfindlich auf eine Basenfehlpaarung und hat in der Analytik das Potential einer strukturempfindlichen Fluoreszenzsonde, während es bei den anderen zwei Duplexen **Py5/C3-Py5/C4** durch die zusätzliche Basenfehlpaarung zu alternativen Konformationen kommt. Diese zeigen ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie die richtig gepaarten Duplexe.

In den CD-Spektren weist der richtig gepaarte Duplex **Py5/C1** bei $\lambda = 406$ nm die größte Intensität auf. Der Intensitätsabfall erfolgt mit steigender Zahl der fehlgepaarten Gegenbase Guanin in der Reihe: **Py5/C1** > **Py5/C2** > **Py5/C3** > **Py5/C4**, also mit zunehmender Störung der helikalen Struktur. Dieser Abfall ist durch die verursachte Störung in der Konformation des Pyrenstapels erklärbar. Dieses Erkenntnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen der temperaturabhängigen CD-Spektroskopie des **Py5/C1** Duplexes (s. Abbildung 5-19 *links*), in der gezeigt werden konnte, dass die thermische Destabilisierung zur Abnahme des excitonischen Signals führt. In der Abbildung 5-19 *rechts* wurden die CD-Spektren bei $\lambda = 406$ nm normiert und der Rückgang des excitonischen Signals gegen die steigende Temperatur aufgetragen. Die Auftragung zeigt deutlich den Zusammenhang der excitonischen CD-Signale und der Duplexstabilität.

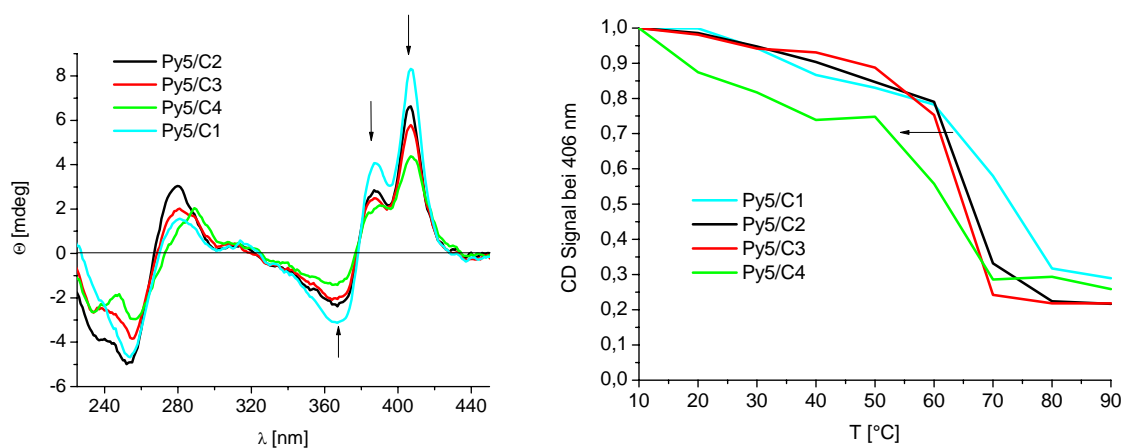


Abbildung 5-19: CD-Spektren von **Py5/C2-C4** im Vergleich zum **Py5/C1** Duplex (*links*). Darstellung der thermischen Stabilität bei $\lambda = 406$ nm (*rechts*). Die Duplexe enthielten 2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i, pH 7.

Der Vergleich der Schmelztemperaturen der Duplexe (**Py5/C1-Py5/C3**) bestätigt die Ergebnisse der CD-Messungen, bei denen Fehlpaarungen zur Destabilisierung der geordneten helikalen Struktur führen (s. Tabelle 5-2). Interessant ist, dass der Duplex **Py5/C4** von diesem Trend abweicht und eine geringere Destabilisierung zeigt als erwartet. Offensichtlich ermöglicht die hohe Zahl an

Fehlpaarung starke hydrophobe Wechselwirkung der Pyren-Chromophore.

Tabelle 5-2: Die Schmelztemperaturen der **Py5/C2-Py5/C4** Duplexe (2.5 μ M DNA in 10 mM NaP_i, pH 7 und 250 mM NaCl).

Duplex	T _m [°C]	ΔT_m [°C] ^b
Py5/C2	72 (61) ^a	+11
Py5/C3	67	+6
Py5/C4	71	+10

a = Die Schmelztemperatur des unmodifizierten Duplexes beträgt 61 °C; **b** = Differenz aus unmodifizierten und pyrenmodifizierten Duplex.

5.4 Zehnfach Py≡-dU-modifiziertes Oligonukleotid

Mit dem fünffach-modifizierten Oligonukleotid **Py5** konnte schon gezeigt werden, dass die Wechselwirkung der Chromophore sowohl im Einzelstrang **Py5** als auch im Duplex **Py5/C1** zu interessanten optischen Eigenschaften führt. Nun stellte sich die Frage, ob der zehnfach modifizierte Duplex **Py5/Py5'** eine geordnete Struktur aufweist und welche optischen Eigenschaften er besitzt. Aufgrund der gegenüberliegenden Py≡-dU-Einheiten ist der Duplex **Py5/Py5'** im Bereich der modifizierten Uridine fünffach fehlgepaart (s. Abbildung 5-20).

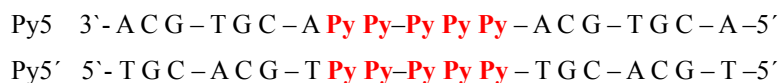


Abbildung 5-20: Sequenz des zehnfach pyrenmodifizierten Duplexes **Py5/Py5'**. Im Bereich der pyrenmodifizierten Uridine ist Duplex fünfmal fehlgepaart.

Als Vergleich dienen die ein- und fünffach Py≡-dU-modifizierten Duplexe **Py1/C1** und **Py5/C1**. Die Absorptionsspektren aller drei Duplexe **Py1/C1**, **Py5/C1** und **Py5/Py5'** zeigen in allen Bereichen deutliche Unterschiede (s. Abbildung 5-21). Das Absorptionsmaximum wird um 13 nm hypsochrom verschoben und gleichzeitig verstärkt. Das zweite Absorptionsmaximum zeigt nur eine geringe Veränderung.

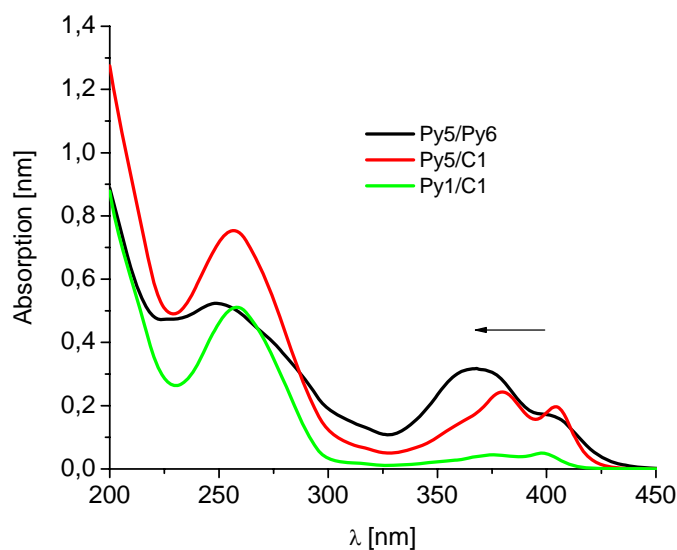


Abbildung 5-21: Absorptionsspektren des **Py5/Py5'** Duplex im Vergleich mit **Py5/C1** und **Py1/C1**. Die Duplexe enthalten 2,5 μ M DNA in 10 mM NaP_i bei pH 7.

Die Fluoreszenzspektren zeigen, dass die Intensität der Fluoreszenzemission im Vergleich zwischen **Py5/C1** und **Py5/Py5'** fast identisch ist (s. Abbildung 5-22). Dies ist ein bemerkenswertes Resultat, da **Py5/Py5'** eine doppelte Anzahl von Chromophoren trägt. Die Rotverschiebung um 55 nm weist auf eine excimerartige Fluoreszenz hin.

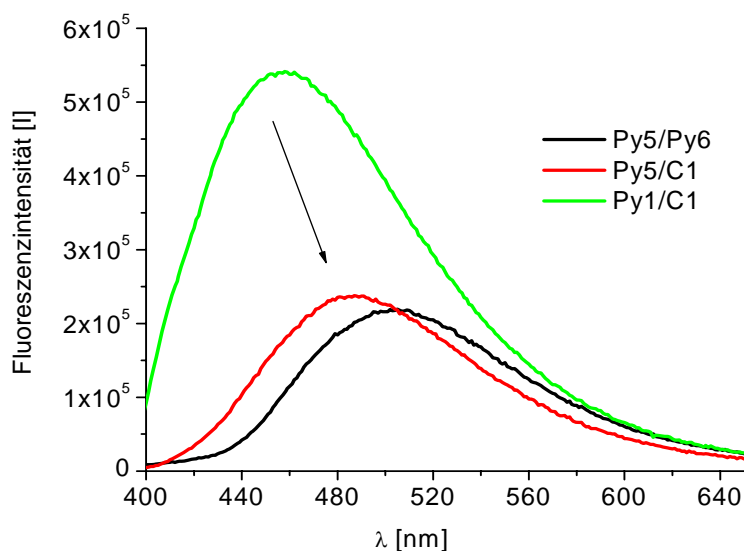


Abbildung 5-22: Fluoreszenzspektren von **Py5/Py5'** Duplex im Vergleich mit **Py5/C1** und **Py1/C1**. Die Duplexe enthalten 2,5 μ M DNA in 10 mM NaP_i, pH 7.

Das CD-Spektrum von **Py5/Py5'** zeigt kaum ein excitonische Signal. Dies erscheint plausibel, da der **Py5/Py5'** Duplex im Pyrenbereich fünffach fehlgepaart ist und somit eine helikale Py≡-dU Anordnung wie in **Py5/C1** unwahrscheinlich ist (s. Abbildung 5-23).

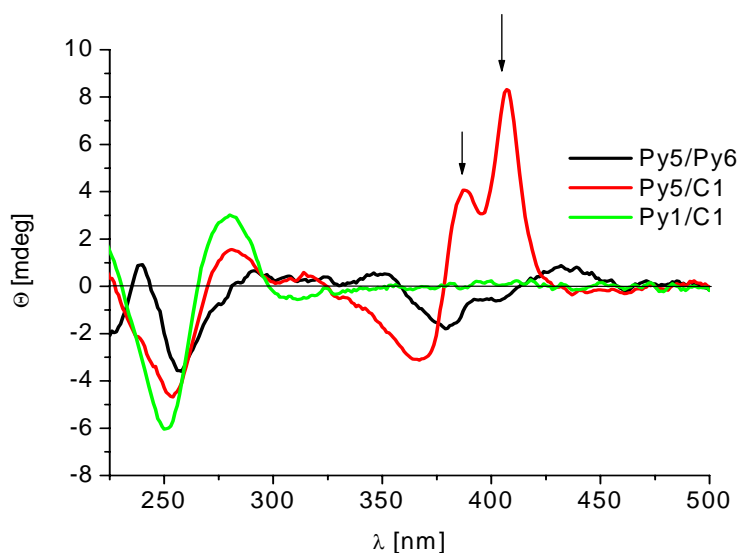


Abbildung 5-23: CD-Spektrum des **Py5/Py6** Duplex, im Vergleich zu **Py5/C1**, **Py1/C1**. Der Duplex enthält 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i (pH7) und 250 mM NaCl.

Die Schmelztemperatur von **Py5/Py5'** ist im Vergleich zum bereits sehr stabilen **Py5/C1** Duplex um weitere drei Grad stabiler.

Tabelle 5-2: Die Probe enthält 2.5 μM DNA in 10 mM NaP_i , pH7 und 250 mM NaCl).

Duplex	T_m [°C]	T_m [°C] ^b
Py5/Py5'	79 (61) ^a	+18

a = Die Schmelztemperatur des unmodifizierten Duplexes beträgt 61 °C; **b** = Differenz aus unmodifizierten und pyrenmodifizierten Duplex.

Trotz der fünffachen Basenfehlpaarung ist diese hohe thermische Stabilität nur dadurch erklärbar, dass die Pyrenchromophore das Duplex durch hydrophobe Wechselwirkungen intermolekular stabilisieren. Als mögliche Anordnung der Pyrenchromophore im **Py5/Py5'**-Duplex zeigt die Abbildung 5-24.

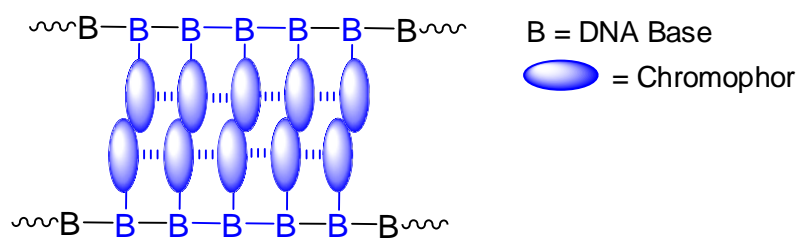


Abbildung 5-24: Mögliche Anordnung der Pyren-Chromophore im **Py5/Py5'**-Duplex.

5.5 Zusammenfassung

Die modifizierten Oligonukleotide mit ein oder zwei Chromophoren werden in der Analytik bereits routinemäßig angewandt.^[243, 244] Über den Einbau von mehreren Chromophoren in DNA und RNA wurde in zunehmender Maße berichtet.^[225-231] Das Ziel dieser Mehrfacheinbauten ist die Verstärkung und Modulation von Fluoreszenzeigenschaften. In dieser Arbeit wurde als Fluoreszenzsonde der 5-(1-Ethynylpyrenyl)-2'-desoxyuridin (**28**) synthetisiert und anschließend zwei- bis fünffach nebeneinander in DNA eingebaut. Die sog. Py≡-dU-modifizierten Oligonukleotide wurden dann auf ihre optischen spektroskopischen Eigenschaften untersucht.

Die Absorptionsspektren der **Py2-5/C1** Duplexe zeigen eine ähnliche Struktur wie die der Einzelstränge, mit nahezu gleichen Absorptionsmaxima im Pyrenbereich. Bei mehr als vier Py≡-dU Einheiten steigt die Absorption nicht mehr additiv sondern stärker. Grund dieses nichtlinearen Verhaltens ist die Grundzustandswechselwirkung der Py≡-dU-Einheiten. Die Absorptionsspektren der **Py-dU1/C1** und **Py-dU5/C1** Duplexe sind gegenüber den Einzelstrangmessungen **Py-dU1**, **Py-dU5** nur leicht verändert. Die Emissionsspektren der Py≡-dU-Duplexe verhalten sich, im Vergleich zu den der Einzelstränge, auch ähnlich. Alle zeigen eine Exciplex-Fluoreszenz mit ähnlichen Emissionsmaxima, aber höherer Intensität im Vergleich zu den Einzelsträngen. Die Fluoreszenzintensität von **Py-dU5/C1** ist im Vergleich zu **Py-dU1/C1** um Faktor 10 erhöht (nicht 5, was man von einem rein additiven Verhalten erwarten würde) und im Vergleich zum Einzelstrang **Py-dU5** sogar um den Faktor 22.

Die zeitaufgelösten transienten Absorptionen bestätigen die elektronische Kopplung zwischen den Pyren-Chromophoren untereinander und zwischen Pyren und Uridin in den einzelnen Chromophoreinheiten. Diese Kopplung kann durch Raum oder durch die DNA erfolgen. Die Raumkopplung ist wesentlich stärker, was anhand der transienten Spektren beim **Py2''/C2''** Duplex beobachtet werden konnte. Diese ist zwischen Pyren-Chromophoren derart ausgeprägt, dass die

DNA wahrscheinlich in diesem Bereich geknickt wird.

Die fünffach modifizierten Duplexe wurden mit drei Gegensträngen hybridisiert, die im Pyrenbereich eine, zwei oder fünf Basenfehlpaarungen hatten. Statt Adenin wurde die isostere Base Guanin verwendet. Während mit Py- \equiv -dU-Oligonukleotiden die Basenfehlpaarung mit Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie nur bedingt nachweisbar war, kann man mit Py-dU-Oligonukleotiden mittels Fluoreszenzspektroskopie, eine oder mehrere Basenfehlpaarungen erkennen. In den CD-Spektren kommt in beiden Fällen durch die Fehlpaarung im Pyrenbereich zur Inhibierung des excitonischen Signals.

Die Absorptionsspektren und Fluoreszenzspektren des zehnfach Py- \equiv -dU-modifizierten Duplexes **Py5/Py5'** zeigen ein deutliches verändertes optisches Verhalten im Vergleich zu **Py5/C1**.

Die Architektur der Duplex-DNA bietet ein geeignetes Gerüst um selbstassoziiierende Helix aus Pyrenchromophoren zu erzeugen. Im hier vorgestellten Beispiel weisen vor allem die CD-spektroskopischen Eigenschaften des helikalen Stapels des fünffachen Py- \equiv -dU-modifizierten Oligonukleotides eine deutliche Sequenzabhängigkeit auf, das ihn zu einer strukturempfindlichen Sonde DNA macht. Die Eigenschaften solcher DNA-Systeme haben Potential für die Anwendungen in der Bioanalytik, z.B. als Nachweis von Basenfehlpaarungen innerhalb eines Codons.

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit wurde 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**1b**) als natürliches β -Nukleosid in Oligonukleotide eingebaut. Das Indolnukleosid wurde als isosterer Purinersatz betrachtet und kann aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren als universelle DNA-Base eingesetzt werden. Duplexe und Indol als artifizielle Base zeigen eine verringerte thermische Stabilität. Die Fluoreszenz des **1b** ist in DNA fast vollständig gelöscht, weil das photoangeregte Indol (In^*) in der Lage ist, alle natürlichen DNA-Basen zu reduzieren. Weiterhin lässt sich das indolmodifizierte Nukleosid **1b** nicht selektiv anregen. Demnach kann **1b** nicht als intrinsische Fluoreszenzsonde betrachtet werden.

Das indolmodifizierte Nukleosid **1b** wurde bei der Untersuchung des oxidativen Lochtransfers in Oligonukleotiden als Lochakzeptor eingesetzt und mit den photoinduzierbaren Lochdonor Ethidium **16** kombiniert. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor betrug zwei Basenpaare. Der Ladungstransfer ist im richtig gepaarten Oligonukleotid im Vergleich zu den Fehlgepaarten am effizientesten. Für die Erkennung der Basenfehlpaarungen nach dem DETEQ-Konzept ist dieses System allerdings ungeeignet.

Das Indolsulfonamid-Nukleosid **7** wurde synthetisiert, charakterisiert und bei der Untersuchung des photoinduzierten Elektronentransfers in entsprechend modifizierter DNA als neuer chemischer Ladungsakzeptor verwendet. Für den chemischen Nachweis diente die photochemische Spaltung der Phenylsulfonyl-Gruppe. Als photoinduzierter Ladungsdonor wurde Phenothiazin eingesetzt. Anhand der Bestrahlungsexperimente konnte eine Umsetzung, die durch Elektronentransfer induziert war, festgestellt werden.

In zweiten Teil wurde die Elektronentransfereffizienz einer metallvermittelten DNA photochemisch untersucht. Dafür wurde 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**25**) als photoinduzierbarer Ladungsdonor und 2'-Desoxyuridin-5-bromuridin (**33**) als chemischer Ladungsakzeptor verwendet. Als metallvermittelte DNA-Base wurde Thio-dU eingesetzt, das selektiv einwertige Metallionen wie Ag(I) chelatisiert und diese zusammen ein metallionenhaltiges Basenpaar bilden. Diese metallvermittelten Basenpaare standen sich im Duplex entweder direkt gegenüber oder waren um ein Basenpaar versetzt angeordnet. Die Bestrahlungsexperimente zeigten, dass die Ladungstransfereffizienz in metallionenfreien Duplexen **Pz1/T1-Pz4/T3** im Vergleich zu metallionenhaltigen Duplexen **Pz1/T1^{2eqAg}-Pz4/T3^{2eAg}** deutlich schneller ist. Bei den

metallionenhaltigen Duplexen **Pz1/T1^{2eqAg}-Pz4/T3^{2eqAg}** wurde eine Sequenzabhängigkeit festgestellt. Der Ladungstransfer ist beim **Pz3/T3^{2eqAg}** Duplex aufgrund des diagonalen metallionenhaltigen Basenpaars etwas langsamer.

Die DNA-basierten Fluoreszenzsonden haben in der Bioanalytik eine zunehmende Bedeutung. So wird im dritten Teil aus mehreren, benachbart eingebauten Py-≡-dU-Chromophoren ein Multichromophorstapel hergestellt. Dieser Multichromophor weist im Vergleich zum einfach modifizierten Duplex interessante, veränderte spektroskopische und strukturelle Eigenschaften auf. Ziel solcher mehrfach fluoreszierenden Oligonukleotide ist die Entwicklung von sequenzspezifischen DNA-Fluoreszenzsonden. Die Untersuchungen zeigten, dass die Py-≡-dU-Einheiten sich im intakten Duplex helikal entlang der DNA-Architektur anordnen. Diese Anordnung führt zu einer intensiven elektronischen Kopplung der Chromophore untereinander, die mit zeitaufgelösten Messungen bestätigt werden konnte. Diese tritt bei Py-≡-dU-modifizierten Duplexen ab drei Py-≡-dU-Einheiten auf, das anhand von CD- und der Absorptionmessungen nachgewiesen wurde. Bei der Einführung einer fehlgepaarten DNA-Base im Gegenstrang wird diese Anordnung empfindlich gestört. Somit kann dieses Multichromophor als strukturempfindliche Sonde verwendet werden. Beim zehnfach Py-≡-dU-modifizierten Duplex (**Py5/Py5'**) konnte im Vergleich zu anderen modifizierten Py-≡-dU-Oligonukleotiden die höchste thermische Stabilität ermittelt werden. Dies könnte durch die alternative Struktur plausibel werden, die nicht von der Intaktheit der *Watson-Crick*-Basenpaarungen abhängt.

7. Materialien und Methoden

7.1. Allgemeines

Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Reagenzien stammten von den Firmen *Merck*, *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar* und *Eurogentech*. Die technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. Alle trockenen Lösungsmittel wurden von den Firmen *Fluka* und *Acros Organics* bezogen und unter Argon aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Frisch destilliertes Pyridin wurde mit Molekularsieb 4 Å versetzt und unter Stickstoff aufbewahrt.

Schutzgas

Alle Reaktionen wurden, falls erforderlich, unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt.

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie:

Es wurden fertig beschichtete DC-Alufolien der Firma *Merck*, verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ belegt sind (Schichtdicke 0.25 mm). Die Detektion der DC-Platten erfolgte mittels Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei 366 nm. Für den chemischen Nachweis wurden folgende Anfärbereagenzien verwendet:

- 5%-ige Lösung von Schwefelsäure in Methanol (Detektion der tritylierten Verbindungen)
- 3%-ige Lösung von Vanillin in Ethanol (Detektion von Indolnukleosiden)
- 5%-ige Lösung von Ninhydrin in Ethanol (Detektion der Amine)

- Präparative DC:

Für die präparative DC wurden DC-Glasplatten der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtet sind.

Flash Chromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (*Fluka*, *Merck*) der Korngröße 0.040-0.063 mm verwendet. Es wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von W.C. Still^[94] mit 0.12 bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgte als Lösung im Laufmittel

oder an Kieselgel adsorbiert.

HPLC

Für die Oligonukleotide:

Reversed-Phase HPLC wurde mit *Schimadzu* HPLC-Anlage durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A). Für die Analytik der Oligonukleotide wurde eine Supelcosil LC-318 Säule (250 mm x 4.6 mm), für die semi-präparative Trennung eine Supelcosil LC-318 (250 mm x 10 mm, ID, 5 µm) Säule, jeweils von *Supelco*, verwendet. Die Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5) als Laufmittel A equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten als Laufmittel B eluiert. Die Analytik und semipräparative Trennung wurden mit folgenden Gradienten durchgeführt:

- 0-15% Acetonitril für unmodifizierte DNA
- 0-20% Acetonitril für indolmodifizierte DNA
- 0-30% Acetonitril für pyrenmodifizierte DNA
- 0-30% Acetonitril für phenothiazinmodifizierte DNA

Die Analytik wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min und die semipräparative Trennung mit 2,5 ml/min durchgeführt. Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte bei folgenden Wellenlängen:

- 260 und 290 nm für un- und indolmodifizierten DNA
- 340 nm für pyrenmodifizierten DNA
- 530 nm für ethidiummodifizierten DNA

Trennung der Verbindung **6aß**:

Die Reinigung und Trennung der Verbindung **6aß** wurden in der Analytikabteilung für HPLC und GC der Universität Regensburg durchgeführt.

Die analytische Trennung wurde an der *Agilent 1100* HPLC-Anlage mit der Säule Luna C18 (2) Säule (150 mm x 4.6 mm, 5 µm) durchgeführt. Die Säule wurde mit 0.0059 % TFA/ Wasser (Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten als Laufmittel B eluiert. Die Analytik wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt: 40-95 % Acetonitril in 40 Minuten, mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die Detektion der Verbindungen **6a** und **6ß** erfolgte bei 240 nm. Die präparative Trennung wurde an der *Knauer* HPLC-Anlage mit der Luna 10 C18 (2) (250 mm x 21.2 mm, 10 µm) Säule jeweils von *Phenomenex* verwendet. Die Säule wurde mit 0.0059 % TFA/ Wasser (Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten als Laufmittel B eluiert. Die präparative Trennung wurde mit folgendem Gradienten durchgeführt:

80-80 % Acetonitril in 50 Minuten, mit einer Fliesgeschwindigkeit von 3 ml/min. Die Detektion der Verbindungen **6a** und **6b** erfolgte bei 240 nm.

Lyophilisation

Wässrige Lösungen wurden in sterilen Kunststoffröhrchen (Falcon-Tubes, 15 ml) mit flüssigem Stickstoff gefroren und an einer *Christ Alpha 2-4* Lyophilisieranlage gefriergetrocknet.

Entsalzen der DNA

Die Entsalzung der DNA wurden mit NAP-5-Säulen der Firma *GE-Healthcare* durchgeführt. Als Equilibrierungs- und Eluierungspuffer diente 5 mM NH_4OAc .

DNA-Festphasensynthese

DNA-Festphasensynthese wurde an einem Expedite 8900 *Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als feste Träger wurden CPGs mit 1 μM Belegung (500 Å) verwendet. Phosphoramidite und CPGs wurden bei *ABI*, *Glen Research* oder *Eurogentec*, Synthesechemikalien bei *ABI* gekauft.

Massenspektroskopie (MS)

Die ESI-Massenspektroskopie (ESI-MS) wurden an der TU München an einem *Finnigan LQC-ESI*-spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden in Methanol oder Acetonitril (*LiChrosolv*, *Merck*) gelöst und durch einen 0.45 μm HPLC-Filter (Fa. *Sartorius*) filtriert.

Die MALDI-TOF der Oligonukleotide wurden an der TU München an einem *Brucker Biflex III* und an der Universität Regensburg an einem *HP G2025 A* Spektrometer im negativen Detektionsmodus aufgezeichnet. Zur Ionisierung diente eine Matrix aus 50 mg/ml Picolinsäure in Acetonitril/ Wasser (1:1) und 50 mg/ml Diammoniumcitrat in Wasser im Verhältnis 9:1. Für eine Probe wurden ca. 2 μl Oligonukleotid-Stammlösung mit 20 μl Matrix vermischt.

Die ESI-, CI-, EI-Massenspektrometrie wurde an der Universität Regensburg von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Abteilung Massenspektroskopie, aufgenommen (s. Tabelle 7-1). Die Angabe der Signale erfolgt in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basissignals. Hochaufgelöste Massenspektroskopie (FT-ICR-MS) wurde bei der Firma *Coring System Diagnostix GmbH* durchgeführt.

Tabelle 7-1:

ESI-MS	<i>Finnigan TSQ 7000-Spektrometer</i>
CI-MS	<i>Finnigan MAT SSQ 710 A</i>
EI-MS	<i>Finnigan MAT SSQ 710 A, Finnigan MAT 95</i>
MALDI-TOF	<i>HP G2025 A</i>

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren an der TU München erfolgte an einem AC 250 und DMX 500 Spektrometer der Firma *Brucker* bei 300 K. Die NMR-Spektren an der Universität Regensburg wurden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Abteilung NMR-Spektroskopie an den Spektrometern der Firma *Brucker* Avance 300 und 600 gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen mit 5 mm Außendurchmesser und enthielten ca. 10 mg Substanz in 0.7 ml Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ sind in ppm und beziehen sich auf Trimethylsilan als Nullpunkt. Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgt in Hz.

Spektroskopie

Alle spektroskopischen Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Quarzküvetten (Firma *Starna*) mit einer Schichtdicke 1 cm bei Raumtemperatur durchgeführt.

Absorption

UV/Vis-Spektren wurden an einem *Varian Cary 100 Bio* mit temperierbaren Küvettenhalter 6x6 aufgenommen und sind gegen das Lösungsmittelsignal korrigiert. Die Aufnahme erfolgt mit folgenden Einstellungen: SBW 1.0, Average time 2 s, Light source changeover 350 nm. Für temperaturabhängige Absorptionsmessungen wird die Temperatur vor der Absorptionsmessung mindestens 5 Minuten konstant gehalten. Für Schmelztemperaturmessungen der Duplexe wurde das Programm *Thermal*, bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Heizkühlrate von 0.7°C/min, verwendet.

Fluoreszenz

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem *Fluoromax-3 (Jobin-Yvon Horiba)* in Fluoreszenzküvetten von 1 cm Länge durchgeführt. Für die Messungen wurden folgende Einstellungen verwendet: Increment 1.0, Integration time 0.2 s, Spaltbreite 2-5 nm. Die Spektren wurden gegen Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Die temperaturabhängige Fluoreszenz wurde von 10°C bis 80°C im Abstand von 10°C aufgenommen. Die Zieltemperatur wurde über ein Peltier-Element LFI-3751 (*Wavelength Electronics*) angesteuert. Vor der

Fluoreszenzmessung wird die Temperatur 5 Minuten konstant gehalten.

Bestimmung der Quantenausbeute

Zur Ermittlung der Quantenausbeute wurde eine schwefelsaure Quinolinsulfatlösung (0.1 N H₂SO₄) verwendet. Für die verdünnten Quinolinsulfatlösungen $<10^{-4}$ M gilt $\Phi_F = 0.546$.^[95]

CD

Die CD-Spektroskopie an der TU München wurden an einem J-715 Spektropolarimeter (*Jasco*) mit Thermostat PTC-150J (*Jasco*) durchgeführt und manuell basislinienkorrigiert. Für die Messungen wurden folgende Einstellungen verwendet; Sensitivity: 100mdeg, Data pitch: 0.1 nm, Scanning mode: Continuous, Scanning speed: 500 nm/min, Response: 0.5 s, Band width: 2 nm. Es wurde der Mittelwert aus fünf Messungen gebildet.

An der Universität Regensburg wurden die CD-Messungen an einem *Jasco* Spektropolarimeter J-710 über einen Peltier-Element PTC 423S/15 gemessen und ebenfalls manuell basislinienkorrigiert. Die Einstellungen; Sensitivity: 100 mdeg, Data pitch: 1 nm, Scanning mode: Continuous, Scanning speed: 200 nm/min, Response: 1 s, Band width: 1 nm, es wurde der Mittelwert aus fünf Messungen gebildet.

CV

Cyclovoltametrische Messungen wurden mit einer Dreielektrodenanordnung aus Gegenelektrode, Pseudo-Referenzelektrode und Arbeitselektrode, die alle aus Platin sind, bei Konzentrationen von ca. 10^{-3} M durchgeführt. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten *EG&G* Model 283 erzeugt, der mit der Software Echem der Firma *EG&G* angesteuert wurde. Die Messzelle wurde vor der Messung mit Argon bzw. mit Stickstoff durchspült und durchgeführt. Für die Messungen wurden trockene Lösungsmittel benutzt. Um eine ausreichende Leitfähigkeit zu gewährleisten und Migrationsströme zu verhindern, wurde den Lösungen Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAHFP) als Leitsalz beigelegt. Die Angabe der Potentialwerte erfolgt gegen Ferrocen/Ferrocenium (Fc/Fc⁺) als internen Standard.

Spektroelektrochemie (SEC)

Für die spektroelektrochemische Messung wurde eine Transmissionszelle aus Quarzglas mit der Dreielektrodenanordnung verwendet. Als Arbeitselektrode wurde ein transparentes Goldminigridnetz (600 Linien/cm) verwendet, das über eine Pt-Folie (Pseudo-Referenzelektrode) kontaktiert ist. Die Gegenelektrode bestand aus V2A-Stahl, der erst vernickelt und anschließend

vergoldet wurde. Das Goldnetz wurde zwischen zwei Quarzglasplatten eingespannt, die durch zwei dünne Glasplättchen auf einen Kapillarspalt von ca. 100 μm eingestellt und durch Kunststoffplatten fixiert wurden. Die zu untersuchende Lösung kann durch Kapillarkräfte in diesen schmalen Spalt diffundieren und steht somit in Kontakt mit dem Goldnetz, wo die Redoxreaktion stattfindet. Zur Lösung der zu untersuchenden Substanz wurden trockene Lösungsmittel verwendet (ca. 4 mL Probenvolumen) und die Zelle vor der Messung mit Argon durchspült. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten *AMEL* Modell 2053 eingestellt. Die spektroskopische Messung erfolgt an einem *Perkin-Elmer* Lambda 9 Spektrometer und wurde mit dem Programm *Perkin-Elmer Pcess* aufgezeichnet.

7.2 Durchführung und Auswertung der Bestrahlungsexperimente

7.2.1 Bestrahlung und Piperidinbehandlung von phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierten Duplexen

Strangbruchexperiment

Die Strangbruchexperimente wurden mit 1 ml einer frisch hybridisierten 4 μM Duplex-Lösung in 10 mM NaP_i -Puffer (pH 7) und 250 mM NaCl in einer 1 cm breiten Quarzglasküvette durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte (75 W Xe-Lampe, *Oriel Instruments*) bei 305 nm Wellenlänge (*cut-off* Filter *Andover Cooperation*) bestrahlt. Alle fünf Minuten wurden 30 μl der Duplexlösung entnommen und nach 60 Minuten Bestrahlung wurde das Experiment abgebrochen.

Die entnommenen Proben wurden jeweils mit 3 μl frisch destilliertem Piperidin und 3 μl 4 μM **C22** (Referenzstrang) versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gefriergetrocknet. Die erste Probe wurde vor der Bestrahlungszeit gezogen und diente bei der Auswertung der Bestrahlungsreihe als Referenzprobe. Die Auswertung erfolgte über die HPLC-Analytik.

HPLC-Analytik

Die Rückstände nach der Gefrier Trocknung wurden für die HPLC-Proben in jeweils 20 μl HPLC-Wasser aufgenommen. Der Gradient verlief von 0 \rightarrow 30 % Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetatpuffer über 45 Minuten.

Auswertung

Als Referenz wurde **C22**, ein unmodifiziertes 19-mer, genommen und auf den Wert 1 gesetzt.

Anschließend wurde ein Quotient aus der Peakhöhen der HPLC-Analytik, aus dem bestrahltem Duplex und **C22** ermittelt und graphisch aufgetragen.

7.2.2 Bestrahlung des indolsulfonamidmodifizierten Nukleosids bzw. -Duplexes

7.2.2.1 Photochemische Entschützung des 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-indols (**7**)

In einem 25 ml Rundkolben wurden 25 mg (0.1 mmol) 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-indol (**7**) in 2 ml eines Lösungsmittels gelöst (s. Tabelle 7-2). Zu dieser Lösung wurden jeweils 0.1 mmol (1 eq) der entsprechenden Verbindung (s. Tabelle 7-2) dazugegeben. Anschließend wurde mit Licht (75 W Xe-Lampe, *Oriel Instruments*) über 305 nm Wellenlänge (*cut-off* Filter *Andover Cooperation*), 4 Stunden bestrahlt. Während der Bestrahlung wurde die Reaktionslösung gerührt. Nach der Bestrahlung wurde die Reaktionsmischung eingeeengt und mit NMR ausgewertet. Die Entschützungsrates von **7** wurde aus dem prozentualen Verhältnis zwischen NH- und H1' bestimmt.

Tabelle 7-2: Auswertung der ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, DMSO-d₆)-

Verbindung	Lösungsmittel	Umsatz ^a
Ethidium-bromid ^b	Methanol	keine Reaktion
10-Methylphenothiazin	Acetonitril/ Methanol	64%
Pyren	Methanol	4%

^a = Quotient zw. NH (**1B**)- und H1' (**7**); ^b = 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid

7.2.2.2 Photochemische Entschützung des indolsulfonamidmodifizierten Duplexes

Zu 1 ml frisch hybridisiertem 5 μM **Is1/C15** Duplex (10 mM NaP_i-Puffer (pH 7), 250 mM NaCl) wurden 4.4 μl (5.5 μM) 10-Methylphenothiazin, in abs. Methanol gelöst, dazu pipettiert. Diese DNA-Lösung wurde in 1 cm breiten Quarzglasküvette vorgelegt und mit Licht (75 W Xe-Lampe, *Oriel Instruments*) über 305 nm Wellenlänge (*cut-off* Filter *Andover Cooperation*), 8 Stunden lang bestrahlt. Alle zwei Stunden wurden 100 μl der Duplexlösung entnommen und lichtgeschützt bei -78°C aufbewahrt. Die erste Probe wurde vor der Bestrahlungszeit gezogen und diente als Referenzprobe. Anschließend wurden die tiefgefrorenen Proben gefriertgetrocknet. Die restliche Duplexlösung wurde entsalzt und massenspektrometrisch analysiert (ESI). Das Experiment wurde drei mal wiederholt.

HPLC-Analytik

Die Rückstände nach der Gefriertrocknung wurden für die HPLC-Analyse in jeweils 30 µl HPLC-Wasser aufgenommen. Der Gradient verlief von 0→20% Acetonitril in 50 mM Ammoniumacetatpuffer über 45 Minuten.

Auswertung

Als Referenz diente der unmodifizierte Gegenstrang und wurde auf den Wert 1 gesetzt. Anschließend wurde ein Quotient, aus der Peakhöhen der HPLC-Analytik, des noch vorhandenen modifizierten Strangs und des unmodifizierten Gegenstrang ermittelt.

Tabelle 7-3: ESI-MS

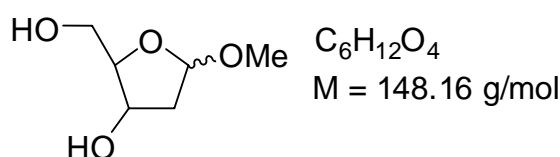
Is1/C15	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]
geschützt	5316,1	5317,2
entschützt	5174,10	k.A.

k.A. = keine Angabe

7.3 Synthesen

7.3.1 Darstellung des Indol-Phosphoramidits

Synthese von 2-Desoxy-1-O-methyl-D-ribofuranose (14)



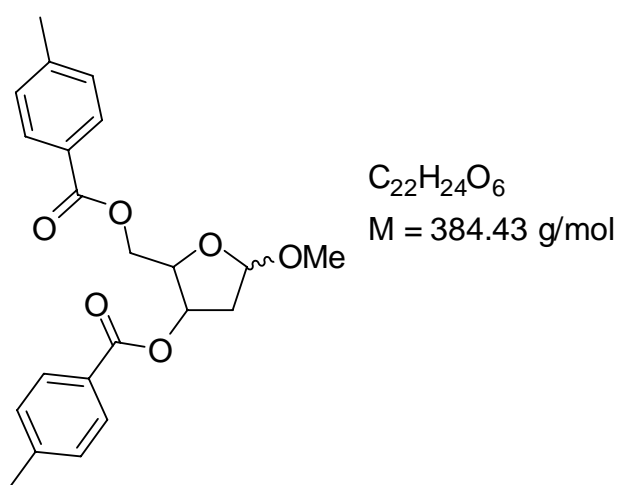
Bei 0 °C wurden unter Schutzgas 1 g (7.46 mmol) 2-Desoxy-D-ribose in 17.5 ml Methanol gelöst. 0.5 ml einer 1.25 M HCl-MeOH Lösung wurden langsam zugetropft und weitere 45 Minuten bei 0 °C gerührt. Unter Lichtschutz wurden 3 g Silbercarbonat zugesetzt und 30 Minuten gerührt. Die grüne Reaktionsmischung wurde filtriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in 30 ml Dichlormethan gelöst und durch einen HPLC-Filter 0.45 µm filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt am Hochvakuumpumpe getrocknet. Erhalten wurde 1.076 g eines farblosen Sirups (7.22 mmol, 97% d.Th.).

DC (Essigester/ Isopropanol/ Wasser 5:3:1) $R_f = 0.78$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 4.95$ (m, 1H, H1), 4.88 (m, 1H, H1), 4.08 (m, 1H, H3), 3.90 (m, 1H, H3), 3.68 (m, 2H, H1), 3.33 (m, 2H, 5-H), 3.22 (s, 3H, CH₃), 3.19 (s, 3H, CH₃), 2.24 (m, 1H, 2-H), 1.97 (m, 1H, 2'-H), 1.86 (m, 1H, 2-H), 1.62 (m, 1H, 2'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 105.5$ (C-1), 105.0 (C-1), 87.8 (C-4), 71.7 (C-3), 70.9 (C-3), 64.0 (C-5), 62.2 (C-5), 55.1 (CH₃), 41.9 (C-2), 41.8 (C-2).

Synthese von 2-Desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-1-O-methyl-D-ribofuranose (4)



2.62 g (17 mmol) 2-Desoxy-1-O-methyl-D-ribofuranose (**14**) wurden in 10 ml abs. Pyridin und 5 ml Chloroform (HPLC grade) unter Stickstoff gelöst und bei 0 °C langsam mit 8,7 ml (66.3 mmol, 3.9 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei 0 °C gerührt und die Reaktion mit 4 g Eis beendet. Das Rohprodukt wurde eingeeengt und über FC (Petrolether/Essigesster 4:1) gereinigt. Man erhielt vollständige Umsetzung (6.53 g, 17 mmol) in Form eines weißes Produktes.

α -Anomer

DC (Petrolether/ Essigester 3:1) $R_f = 0.37$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.83$ (m, 4H, Ar-H, H-2 und H-6), 7.30 (m, 4H, Ar-H, H-3 und H-5), 5.35 (m, 1H, H3'), 5.15 (d, $J = 4.8 \text{ Hz}$, 1H, H1'), 4.47 (m, 3H, 4'-H, 2 x H5'), 3.3 (s, 6H, Me-Ar), 2.49 (m, 1H, H2'β), 2.36 (s, 3H, OMe), 2.39-2.33 (m, 1H, H2'α).

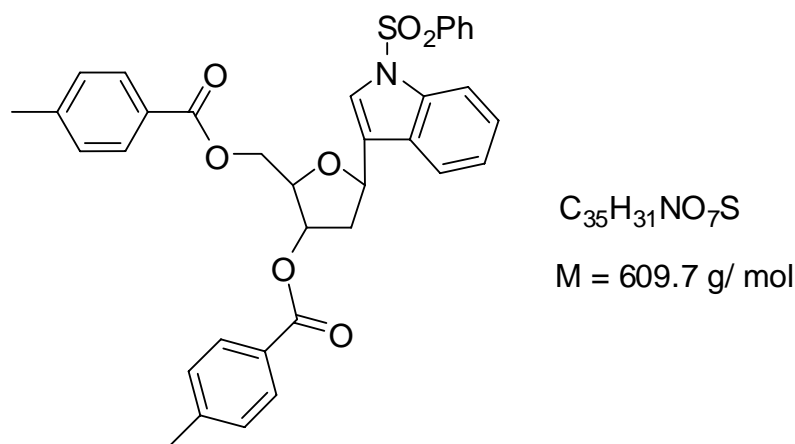
β -Anomer

DC (Petrolether/ Essigester 4:1) $R_f = 0.42$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.89\text{--}7.84$ (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 4H, Ar-H, H-2 und H-6), 7.32-7.29 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 4H, Ar-H, H-3 und H-5), 5.48 (m, 1H, H3'), 5.21-5.16 (dd, $J_{\text{H1}',\text{H2}\alpha} = 5.4 \text{ Hz}$, , $J_{\text{H1}',\text{H2}\beta}$

2.4 Hz, 1H, H1'), 4.45 (m, 2H, 4'-H, H5'), 4.33 (dd, $J_{H5'', H5'} = 8$ Hz, $J_{H5'', H4} = 13.3$ Hz, 1H, H5''), 3.32 (s, 6H, Me-Ar), 2.4 (m, 1H, H2'β), 2.38 (s, 3H, OMe), 2.36 (m, 1H, H2'α).

Synthese von 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-D-ribofuranosyl)-indol (6αβ)



6.18 g (16.1 mmol) 2-Desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-1-O-methyl-D-ribofuranose (**4**) und 5.1 g (19.3 mmol, 1.2 eq) 1-Phenylsulfonylindol (**5**) wurden unter Stickstoffatmosphäre in 15 ml abs. Dichlormethan gelöst und auf -15 °C abgekühlt. Anschließend wurden vorsichtig 14 ml (35.9 mmol, 6.9 eq) BF₃·Et₂O zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 90 Minuten unter Lichtschutz und bei -15°C gerührt und anschließend die Reaktion mit 50 ml ges. Natriumcarbonat abgebrochen. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumhydrogensulfat getrocknet und eingeeengt. Nach FC (Petrolether/ Essigester 8:1) erhält man 2.58 g (26 %) 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-β-D-ribofuranosyl)-indol **6β** (weißes Pulver) und 0.83 g (8.5 %) 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-3,5-di-O-para-toluoyl-α-D-ribofuranosyl)-indol **6α** (weißes Pulver).

α-Anomer (6α)

DC (Petrolether/Essigester 3:1) R_f = 0.41.

FT-ICR-MS: m/z (%) 610.1890 (100) [M+H]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.94-7.88 (m, 6H, Ar-H), 7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 1H, Ar-H), 7.39 (m, 2H, Ar-H), 7.31-7.21 (m, 4H, Ar-H), 7.06 (m, 1H, Ar-H), 5.61 (m, 1H, H3'), 5.55 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, H1'), 4.56 (m, 2H, H5'), 4.53 (m, $J_{H5'', H5'} = 4.5$ Hz, $J_{H5'', H4'} = 11.8$ Hz, 1H, H5''), 4.51 (m, 1H, H4'), 2.99 (m, H2'β), 2.50 (m, 1H, H2'α), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ = 166.7, 166.4, 144.2, 144.1, 137.8, 133.9, 129.45, 129.4, 129.1, 129.0, 128.8, 126.83, 126.6, 126.5, 124.7, 123.6, 123.2, 123.1, 120.2, 111.4, 82.1, 78.1, 77.7,

77.3, 76.5, 74.3, 64.2, 37.6, 20.6.

β -Anomer (**6B**)

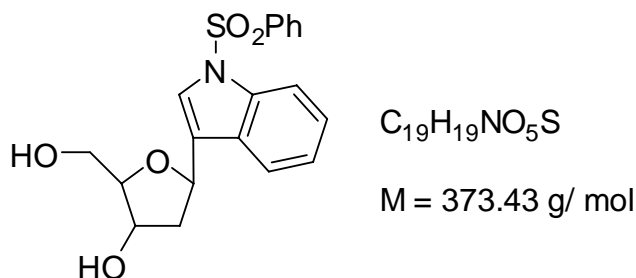
DC (Pethrolether/Essigester 3:1) $R_f = 0.44$.

FT-ICR-MS: m/z (%) 610.1890 (100) $[M+H]^+$.

1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7.96$ -7.91 (m, 4H, p-Tol, H2 und H6), 7.96-7.91 (m, 2H, SO₂-Ph, H2 und H6), 7.83 (s, 1H, Ind-H2), 7.69-61 (m, 1H, Ind-H6), 7.51 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ind-H5), 7.34-7.27 (m, 4H, p-Tol, H3 und H5), 7.34-7.27 (m, 2H, SO₂-Ph, H3 und H5), 7.06-7.03 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, SO₂-Ph H4), 5.61 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H3'), 5.43 (dd, $J_{H1', H2'\alpha} = 5.2$ Hz, $J_{H1', H2'\beta} = 10.4$ Hz, 1H, H1'), 4.61 (dd, $J_{H5', H5''} = 4$ Hz, $J_{H5', H4'} = 11.8$ Hz, 1H, H5'), 4.53 (dd, $J_{H5', H5''} = 4.5$ Hz, $J_{H5', H4'} = 11.8$ Hz, 1H, H5'), 4.46 (m, 1H, H4'), 2.55 (dd, $J_{H2'\alpha, H2'\beta} = 5.5$ Hz, $J_{H2'\alpha, H1'} = 13.3$ Hz, 1H, H2' α), 2.46 (m, 1H, H2' β), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 165.5, 165.4, 143.9, 143.8, 136.9, 134.7, 134.6, 129.8, 129.4, 129.3, 129.26, 129.23, 128.4, 126.7, 126.7, 126.6, 125.0, 123.7, 123.1, 122.2, 120.9, 113.22, 82.1, 76.6, 73.8, 64.3, 21.16, 21.13$.

Synthese von 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**7**)



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 692 mg (1.13 mmol) 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**6B**) in 20 ml abs. Methanol gelöst und mit 183 mg (3.39 mmol, 3 eq) Natriummethylat versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 6 Stunden gerührt und dann eingedampft. Nach FC (Toluol/ Dichlormethan/ Methanol 5:5:1 \rightarrow Toluol/ Dichlormethan/ Methanol 1:1:1) erhält man 350 mg (83 %) eines hell-gelben Feststoffs.

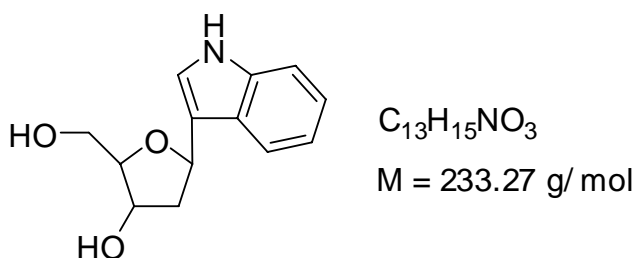
DC (Toluol/ Dichlormethan/ Methanol 5:5:1) $R_f = 0.25$.

ESI-MS: m/z (%) 374.1 (100) $[M+H]^+$, 391.2 (90) $[M+NH_4]^+$.

1H -NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.99$ -7.97 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar_{Ind}-H, H7), 7.97-7.87 (m, 2H, Ph-SO₂-H, H-2 und H6), 7.6-7.57 (d, $J = 7.8$ Hz, Ar_{Ind}-H, H4), 7.56-7.51 (m, 1H, Ph-SO₂, H3), 7.53 (s,

Ar_{Ind}-H, H2), 7.46-7.41 (m, 2H, Ph-SO₂, H2 und H4), 7.36-7.3 (dt, $^2J = 1.7$ Hz, $^3J = 7.2$ Hz, 1H, Ar_{Ind}-H, H6), 7.26-7.21 (dt, $^2J = 0.8$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, Ar_{Ind}-H, H5) 5.36 (dd, $J_{H1', H2'\alpha} = 9$ Hz, $J_{H1', H2'\beta} = 6$ Hz, 1H, H1'), 4.5 (m, 1H, H3'), 4.02 (dt, $J_{H4', H5'} = 4.3$ Hz, $J_{H4', H3'} = 3.4$ Hz, 1H, H4'), 3.78 (m, 2H, H5'), 2.3-2.23 (m, 2H, H1' α , H1' β)
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 135.5, 133.8, 130.1, 129.3, 128.9, 126.8, 125.0, 123.4, 122.9, 122.6, 120.3, 113.7, 87.1, 73.7, 73.6, 63.1, 41.8, 30.9, 29.7$.

Synthese von 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**1b**)



Weg A:

Unter der Stickstoffatmosphäre wurden 790 mg (1.3 mmol) 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy-3,5-di-*O*-para-toluoyl- β -D-ribofuranosyl)-indol (**7**) in 20 ml abs. Methanol gelöst und mit 236 mg (4.37 mmol, 3 eq) Natriummethylat versetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 6 Stunden gerührt und dann ohne Aufarbeitung eingedampft. Nach FC (Toluol/ Dichlormethan / Methanol 5:5:1 \rightarrow Toluol/ Dichlormethan / Methanol 1:1:1) erhält man jeweils 30 mg (10 %) des 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indols (**1b**) (weißer Feststoff) und 30 mg (10 %) des 3-(2'-Desoxy- α -D-ribofuranosyl)-indols (**1a**).

Weg B:

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.0 g (1.65 mmol) 1-Phenylsulfonyl-3-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**7**), 646 mg (2.47 mmol, 1.5 eq) 18-Krone-6 und 2 g Kaliumhydroxid (Überschuß) in je 5 ml abs. 1,4-Dioxan und abs. Methanol gelöst und für 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtschutz gerührt. Das Rohprodukt wurde mit Dichlormethan extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Nach der FC (Diethylether/ Essigester 2:1 \rightarrow Diethylether/ Essigester 1:3) wurde 60 mg (15%) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (**1b**) (weißer Feststoff) und 60 mg (15%) 3-(2'-Desoxy- α -D-ribofuranosyl)-indol (**1a**) (weißer Feststoff) erhalten.

α -Anomer (1a)

DC (Toluol/ Dichlormethan/ Methanol 5:5:1) $R_f = 0.14$ und **DC** (Diethylether/ Essigester 1:1) $R_f = 0.2$.

ESI-MS: m/z (%) 234.1 (100) $[M+H]^+$, 251.1 (50) $[M+NH_4]^+$, 484.3 (30) $[2M+NH_4]^+$, 489.3 (25) $[2M+Na]^+$

1H -NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 10.89$ (bs, 1H, NH), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, Ar-H, H7), 7.3 (m, 1H, Ar-H, H4), 7.23 (d, $^3J = 2.2$ Hz, Ar-H, H2), 7.05 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H6), 6.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 4.55 (dd, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 1.6$ Hz, 1H, H1'), 4.0 (s, 1H, H3'), 3.5 (m, 1H, H4'), 3.49-3.39 (dq, $^3J = 5$ Hz, $^2J = 17.6$ Hz, 2H, H5'), 2.15 (m, 1H, H2'\beta), 1.75 (dd, $^2J = 11.8$ Hz, $^3J = 4.2$ Hz, H2'\alpha).

 β -Anomer (1b)

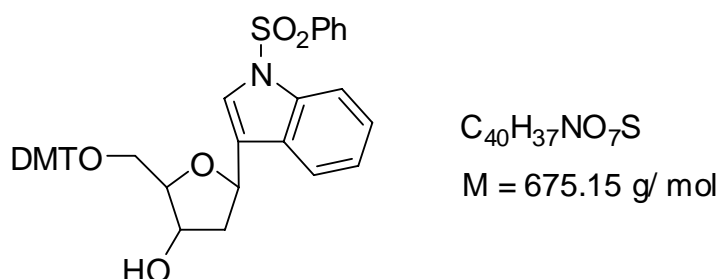
DC (Toluol/ Dichlormethan/ Methanol 5:5:1) $R_f = 0.15$ und **DC** (Diethylether/ Essigester 1:1) $R_f = 0.3$.

ESI-MS: m/z (%) 234.1 (100) $[M+H]^+$, 251.1 (50) $[M+NH_4]^+$, 484.3 (30) $[2M+NH_4]^+$, 489.3 (25) $[2M+Na]^+$.

1H -NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 10.91$ (bs, 1H, NH), 7.56 (d, $^3J = 7.9$ Hz, Ar-H, H7), 7.33 (d, $^3J = 8.1$ Hz, 1H, Ar-H, H4), 7.22 (d, $^3J = 2.2$ Hz, Ar-H, H2), 7.08 (dt, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz, 1H, H6), 6.95 (dt, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 1H, H5), 4.94 (dd, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 1.6$ Hz, 1H, H1'), 4.0 (s, 1H, H3'), 3.5 (m, 1H, H4'), 3.49-3.39 (dq, $^3J = 5$ Hz, $^2J = 17.7$ Hz, 2H, H5'), 2.15 (dd, $^3J = 9.3$ Hz, $^2J = 19.5$ Hz, 1H, H2'\alpha), 1.95 (m, 1H, H2'\beta).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 136.6, 125.9, 121.0, 119.5, 118.3, 116.4, 111.4, 72.2, 70.4, 68.6, 67.4, 66.3, 60.3$.

Synthese von 1-Phenylsulfonyl-3-[2'-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofurano-syl]-indol (8)



Unter Stickstoffatmosphäre wurden 350 mg (0.93 mmol) 3-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-indol (7) in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 392 μ l (2.79 mmol, 3 eq) über Molsieb getrocknetem Triethylamin versetzt. Nach 15 Minuten rühren bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß

wurden 411 mg (1.21 mmol, 1.3 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid dazugegeben und bei Raumtemperatur über die Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit 5 ml Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck eingengt. Das Produkt (**8**) wurde durch FC (Petrolether/ Essigester 2:1+ 0.1% Triethylamin) als gelber Feststoff (440 mg, 69 %) erhalten.

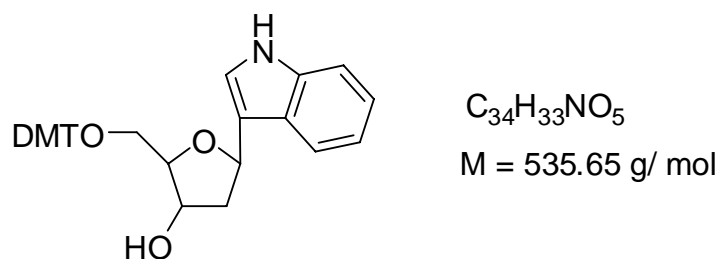
DC (Hexan/ Essigester 1:1) $R_f = 0.5$.

ESI-MS: m/z (%) 734.3 (100) $[M+CH_3COO^-]$, 710.2 (25) $[M+Cl^-]$.

1H -NMR (300 MHz, Methanol): $\delta = 7.95$ (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar_{Ind}-H, H7), 7.73-7.66 (m, 4H, Ar-H), 7.44-7.4 (dd, 2H, Ar-H), 7.32-7.25 (m, 10H, Ar-H), 7.08-7.03 (t, 2H, Ar-H), 6.7-6.6 (2xdd, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 2.2$ Hz, 4H, 2xAr_{DMT}-H, H3 und H5), 5.29 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H, H1') 4.94 (d, $J = 4$ Hz, 1H, H3'), 4.0 (bs, 1H, 3'-OH), 3.93 (m, 1H, H4'), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.68 (s, 3H, OMe) 3.12-3.03 (m, 2H, H5'), 2.2 (m, 2H, H2' α und H2' β).

^{13}C - NMR (100 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 157.95, 157.93, 149.6, 144.9, 136.84, 136.07, 135.55, 135.52, 134.7, 134.45, 129.65, 129.62, 128.8, 127.7, 126.6, 126.5, 124.9, 124.0, 123.8, 123.2, 122.6, 121.1, 113.1, 113.07, 113.04, 85.9, 85.3, 73.1, 72.2, 64.3, 54.9, 41.25, 41.2, 29.5$.

Synthese von 3-[2'-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-indol (**2**)



440 mg (0.65 mmol) 1-Phenylsulfonyl-3-[2'-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- β -D-ribofuranosyl]-indol (**8**) wurden unter Stickstoffatmosphäre mit 263 mg (0.98 mmol, 1.5 eq) 18-Krone-6, 1.21 g (21.5 mmol) Kaliumhydroxid in jeweils 10 ml abs. 1,4-Dioxan und 10 ml abs. Methanol gelöst. Anschließend wurde die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur und Lichtschutz gerührt. Das Rohprodukt eingengt und mit FC (Petrolether/ Essigester 2:1 \rightarrow Petrolether/ Essigester 1:1) gereinigt. Man erhielt 320 mg (80%) eines gelb-öligen Produkts **2**.

DC (Petrolether/ Essigester 1:1) $R_f = 0.41$.

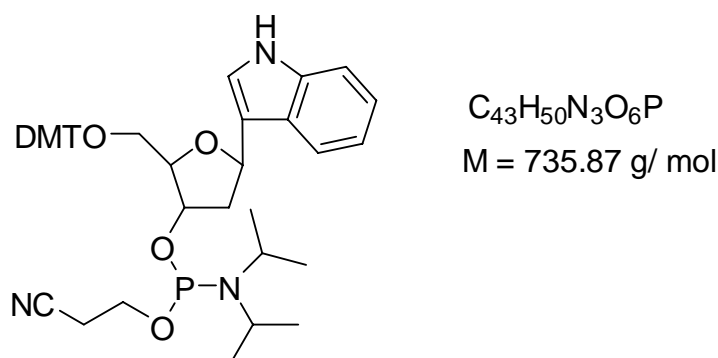
ESI-MS: m/z (%) 594.4 (100) $[M+CH_3COO^-]$, 534.4 (28) $[M-H^+]$.

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.74$ (d, 1H, Ar_{Ind}-H, H7), 7.62-7.58 (m, 2H, Ar-H), 7.47-7.19 (m,

14H, Ar-H), 7.07 (m, 2H, Ar-H), 6.9-6.81 (m, 5H, Ar-H), 5.29 (dd, $J_{H1',H2'\alpha}=5.4$ Hz, $J_{H1',H2'\beta}=10.2$ Hz 1H, H1'), 4.54 (m, 1H, H3'), 4.1 (m, 1H, H4'), 3.75 (s, 3H, OMe), 3.74 (s, 3H, OMe) 3.12-3.03 (m, 2H, H5'), 2.2 (m, 1H, H2'α), 2.05 (m, 1H, H2'β).

¹³C- NMR (75.5 MHz, DMSO-d): δ = 157.94, 157.72, 144.9, 136.84, 136.98, 135.66, 135.52, 134.53, 129.75, 129.63, 128.81, 127.6, 127.5, 127.3, 126.6, 124.3, 123.2, 113.0, 112.7, 85.2, 85.1, 73.0, 68.6, 64.1, 56.5, 54.92, 29.5.

Synthese von 2'-Desoxy-5-O-dimethoxytrityl-1-(3-indolyl)-β-D-ribofuranose-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit] (3)



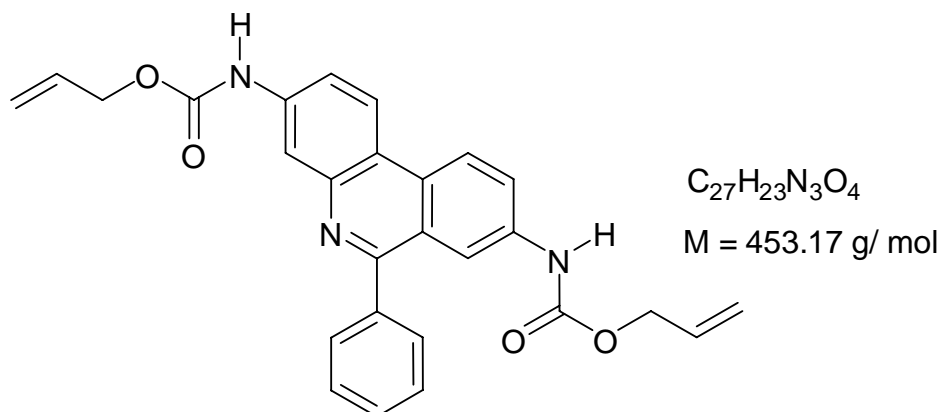
160 mg (0.3 mmol) 3-[2'-Desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-indol (**2**) wurden unter Stickstoffatmosphäre in 10 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 127 µl (0.9 mmol, 3 eq) über Molsieb getrockneten Triethylamin versetzt. Nach 15 Minuten Rühren bei Raumtemperatur, wurden 106 µl (0.45 mmol, 1.5 eq) 2-Cyanoethyl)-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben und anschließend für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit frischer, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (20 ml) abgebrochen und gewaschen. Die organische Phase wurde sofort über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt und an der Hochvakuumpumpe getrocknet. Man nahm vollständigen Umsatz an und stellte eine 0.085 M Lösung des Phosphoramidits (**3**) in 3.5 ml abs. Acetonitril her, die unmittelbar für die Oligonukleotidsynthese verwendet wurde.

DC (Hexan/ Essigester 2:1) $R_f = 0.85$.

³¹P-NMR (121.5 MHz, CDCl₃): δ= 147.9, 148.8.

7.3.2 Darstellung des Ethidium-Phosphoramidits

Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (17)



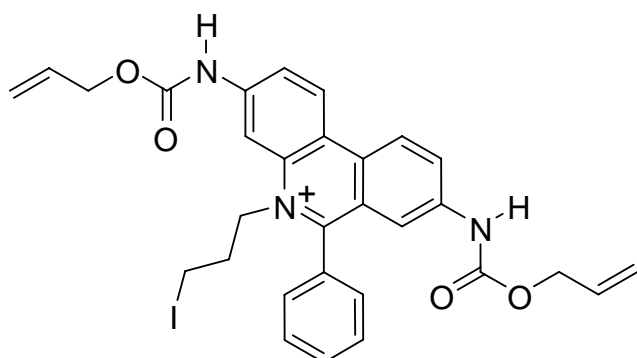
Unter Argonatmosphäre wurden 5 g (17.5 mmol) 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (**16**) in 150 ml abs. Dichlormethan suspendiert und 18.6 ml (0.18 mol, 10 eq) Chlorameisensäureallylester vorsichtig zugetropft. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 100 ml 6 N Ammoniaklösung abgebrochen. Der braune Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im HV getrocknet. Man erhielt 7.76 g (17.15 mmol, 98 % d.Th.) eines braunen Feststoffes.

DC (Essigester/ Methanol/ Wasser 6:2:1) $R_f = 0.96$.

ESI-MS: m/z (%) 454.2 (100) $[M+H]^+$, 338.4 (12) $[M+H-2 \times C_3H_6O]^+$, 396.3 (24) $[M+H-C_3H_6O]^+$.

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 10.08 (s, 1H, NH), 10.06 (s, 1H, NH), 8.74 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 1H, H1), 8.64 (d, $^3J = 9.0$ Hz, 1H, H10), 8.28 (s, 1H, H4), 8.20 (s, 1H, H7), 7.96 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, H9), 7.80 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 1H, H2), 7.68 (m, 2H, Ph), 7.57 (m, 3H, Ph), 6.10-5.90 (m, 2H, $CH_2=CH$), 5.37 (m, 2H, $CH_2=CH$), 5.24 (m, 2H, $CH_2=CH$), 4.67 (d, $^3J = 5.70$ Hz, 2H, CH_2O), 4.60 (d, $^3J = 5.70$ Hz, 2H, CH_2O).

Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodopropyl)-6-phenyl-phenanthridi-nium Iodid (18)



$\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{IN}_3\text{O}_4^+$ $M = 622.12 \text{ g/mol}$

$\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_4$ $M = 749.02 \text{ g/mol}$

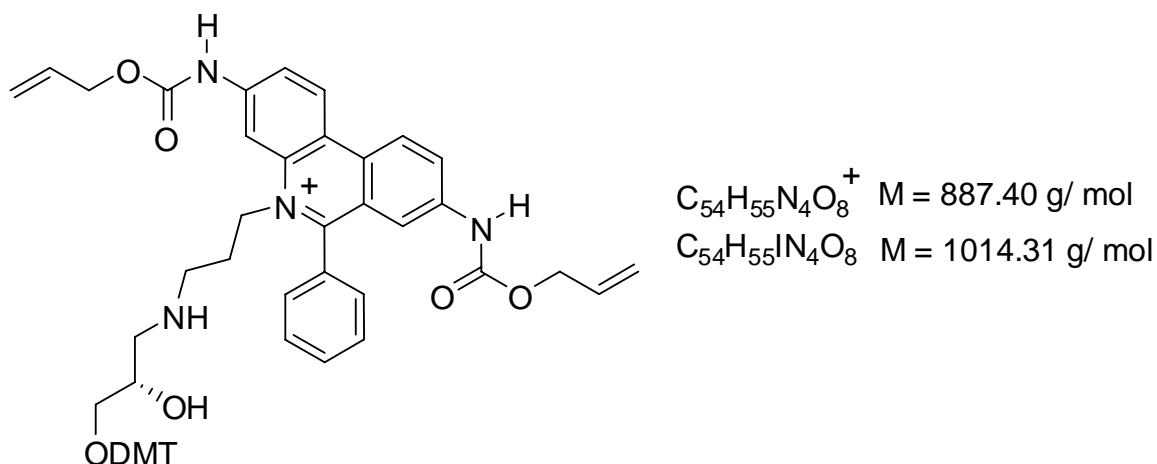
5,0 g (11 mmol) 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (**17**) wurde in 40 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 13 ml 1,3-Diodpropan erhitze man 9 Tage unter Rückfluss. Danach wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit Tetrahydrofuran gewaschen und an der Hochvakuumpumpe getrocknet. Man erhielt 6.72 g (9.02 mmol, 82 %) eines orangen Pulvers.

DC (Dichlormethan/ Methanol 20:3) $R_f = 0.52$.

ESI-MS: m/z (%) 622.1 (100) $[\text{M}]^+$, 564.2 (10) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$, 466.5 (15).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): $\delta =$ 10.53 (s, 1H, NH, 3-Alloc), 10.32 (s, 1H, NH, 8-Alloc), 9.05 (d, $^3J = 9.4 \text{ Hz}$, 1H, H1), 8.99 (d, $^3J = 9.1 \text{ Hz}$, 1H, H10), 8.54 (s, 1H, H4), 8.24 (dd, $^3J = 9.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H9), 8.14 (dd, $^3J = 9.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H2), 7.78 (s, 1H, H7), 7.85-7.72 (m, 5H, 6-Ph), 6.03 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, 3-Alloc), 5.91 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, 8-Alloc), 5.43 (dd, $^2J = 1.7 \text{ Hz}$, $^3J = 17.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, trans, 3-Alloc), 5.32 (dd, $^2J = 1.7 \text{ Hz}$, $^3J = 17.8 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, trans, 8-Alloc), 5.29 (dd, $^2J = 1.1 \text{ Hz}$, $^3J = 10.5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, cis, 3-Alloc), 5.22 (dd, $^2J = 1.3 \text{ Hz}$, $^3J = 10.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, cis, 8-Alloc), 4.71 (m, 2H, H1'), 4.68 (m, 2H, OCH_2 , 3-Alloc), 4.55 (m, 2H, OCH_2 , 8-Alloc), 3.27 (t, $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, 2H, H-3'), 2.41 (m, 2H, H2').

Synthese von (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-(3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino)-propyl)-6-phenyl-phenanthridin Iodid (19)



Zu einer Lösung von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iod-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (1.12 g, 1.5 mmol) (**18**) und DIPEA (0.45 μl , 3 mmol, 2 eq) in 60 ml Dimethylformamid wurde die Verbindung (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-methoxy]-propan-2-ol (649 mg, 1.65 mmol, 1.1 eq) hinzugegeben und 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde erneut (S)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-methoxy]-propan-2-ol (236 mg, 0.6 mmol, 0.4 eq) und nochmals DIPEA (0.22 ml, 1.5 mmol, 1 eq) hinzugefügt und weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Dann wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingeeengt und im Anschluss über FC (Dichlormethan/ Methanol 100:3 + 0.1 % Pyridin, Eluent: Dichlormethan/ Methanol 10:3 + 0.1 % Pyridin) gereinigt. Nach dem Trocknen im HV erhielt man einen gelbbraunen Feststoff (1.32 g, 87 %).

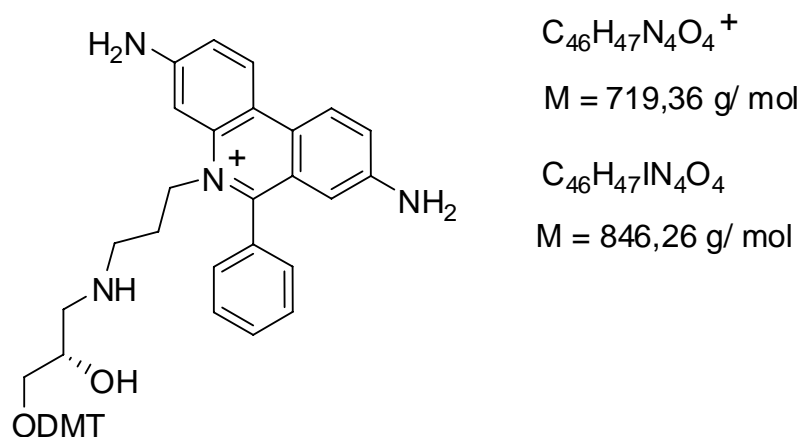
DC (Dichlormethan/ Methanol 10:3) $R_f = 0.82$.

ESI-MS: m/z (%) 887.4 (100) $[\text{M}]^+$, 585.4 (28) $[\text{M}+\text{H}-\text{DMT}]^+$, 303.4 (40) $[\text{DMT}]^+$, 468.4 (22).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta =$ 10.66 (s, 1H, NH, 3-Alloc), 10.38 (s, 1H, NH, 8-Alloc), 9.11 (d, $^3J = 9.1 \text{ Hz}$, 1H, H1), 9.05 (d, $^3J = 9.3 \text{ Hz}$, 1H, H10), 8.65 (s, 1H, H4), 8.28 (dd, $^3J = 9.0 \text{ Hz}$, $^4J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, H9), 8.11 (dd, $^3J = 9.0 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H2), 7.78 (s, 1H, H7), 7.83-7.73 (m, 5H, 6-Ph), 7.38 (m, 2H, arom, DMT), 7.32-7.20 (m, 7H, arom, DMT), 6.88 (m, 4H, arom, DMT), 5.99 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, 3-Alloc), 5.92 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, 8-Alloc), 5.38 (dd, $^2J = 1.7 \text{ Hz}$, $^3J = 17.1 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, trans, 3-Alloc), 5.32 (dd, $^2J = 1.7 \text{ Hz}$, $^3J = 17.0 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, trans, 8-Alloc), 5.27 (dd, $^2J = 1.3 \text{ Hz}$, $^3J = 10.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, cis, 3-Alloc), 5.22 (dd, $^2J = 1.3 \text{ Hz}$, $^3J = 10.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$, cis, 8-Alloc), 4.68 (d, $^3J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, OCH_2 , 3-Alloc), 4.57 (d, $^3J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, OCH_2 , 8-Alloc), 4.53 (m, 2H, H1'), 3.78 (m, 1H, CHOH), 3.69 (s, 6H, OMe), 2.96 (m, 1H, CH_2ODMT),

2.74 (m, 2H, H3'), 2.74 (m, 1H, CH₂NH₂), 2.83 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.56 (m, 1H, CH₂NH₂), 2.10 (m, 2H, H2').

Synthese von (S)-3,8-Bis-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (20)



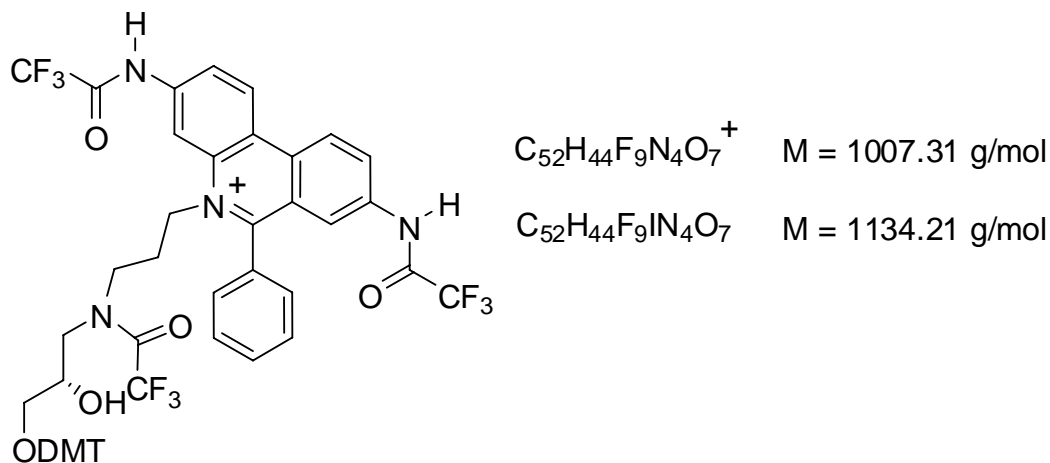
Pd(Ph₃)₄ (20 mg, 0.02 mmol, 0.02 eq), PPh₃ (52 mg, 0.2 mmol, 0.2 eq) und Bu₃SnH (870 mg, 3 mmol, 3.2 eq) wurden zu einer Lösung des Edukts (S)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-(3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino)-propyl))-6-phenyl-phenanthridin Iodid (**19**) (0.95 g, 0.94 mmol) in 30 ml abs. Dichlormethan und 100 µl Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Wasser abgebrochen und die Lösung im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Das Rohprodukt wurde durch FC (Dichlormethan/ Methanol 100:5 + 0.1 % Pyridin, Eluent: Essigester/Methanol/Wasser 6:2:2 + 0.1 % Pyridin) gereinigt. Man erhielt 0.71 g (90 %) eines violetten Feststoffes.

DC (Essigester/ Methanol/ Wasser) $R_f = 0.84$.

ESI-MS: m/z (%) 719.3 (100) [M]⁺, 303.4 (44) [DMT]⁺, 344.4 (83).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.69 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H, H1), 8.63 (d, ³J = 8.9 Hz, 1H, H10), 7.7 (m, 5H, 6-Ph), 7.56 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, H9), 7.52 (s, 1H, H4), 7.39 (m, 2H, arom, DMT), 7.38 (d, ³J = 9.5 Hz, 1H, H2), 7.34-7.18 (m, 7H, arom, DMT), 6.90 (m, 4H, arom, (DMT) 6.39 (s, 2H, 3-NH₂), 6.27 (s, 1H, H7), 5.51 (s, 1H, OH), 5.35 (s, 1H, 8-NH₂), 4.46 (m, 2H, H1'), 3.88 (m, 1H, CHOH), 3.72 (s, 6H, OCH₃), 3.41 (s, 1H, NH), 3.01 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.96 (m, 2H, H3'), 2.95 (m, 1H, NCH₂CHOH), 2.82 (m, 1H, CH₂ODMT), 2.69 (m, 1H, NCH₂CHOH), 2.18 (m, 2H, H2').

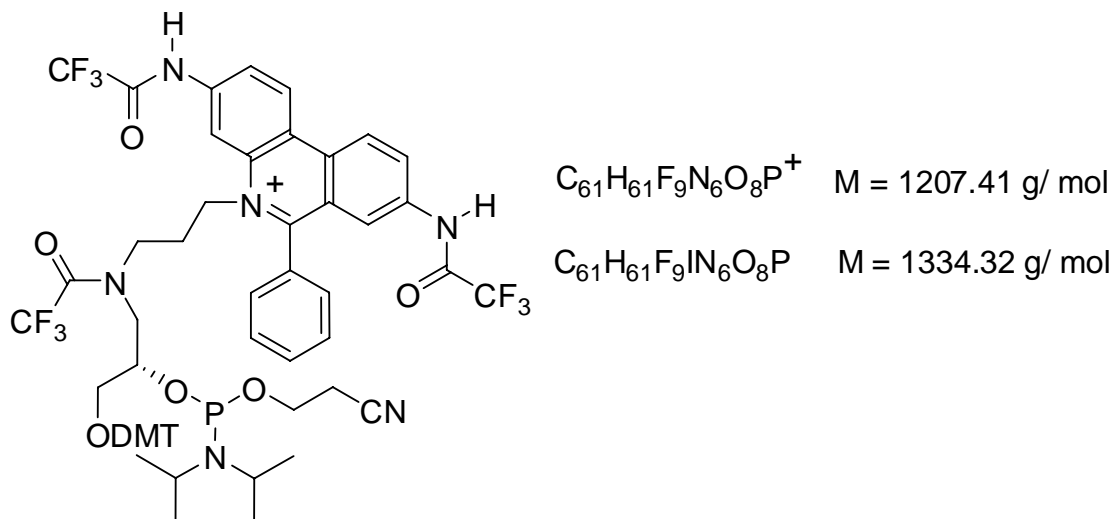
Synthese von (S)-3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (21)



Unter Argonatmosphäre und bei 0 °C wurden 0.9 ml (11 mmol) Pyridin und 760 µl (5.4 mmol, 6 eq) Trifluoressigsäureanhydrid zu einer Lösung der Ausgangsverbindung (S)-3,8-Bis-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (**20**) (0.77 g, 0.9 mmol) in 4.5 ml abs. Dichlormethan gegeben. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 0 °C und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mehrmals zügig mit ges. wässriger NaHCO₃-Lösung gewaschen, bis der Trifluoracetylesther an der 2-Hydroxygruppe entschützt war. Die Entschützung wurde mittels ESI-MS kontrolliert. Anschließend wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum Lösungsmittelreste entfernt. Man erhielt 0.68 g (67 % d.Th.) eines gelb-braunen Feststoffs.

ESI-MS: m/z (%) 1007.3 (100) [M]⁺, 303.4 (27) [DMT]⁺.

Synthese von (S)-3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-{3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropyl-amino-phosphanyloxy]-propyl)-(2,2,2-trifluoracetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (22)

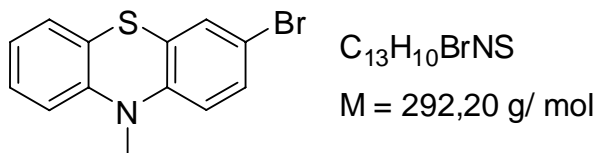


889 mg (0.78 mmol) (S)-3,8-Bis-trifluoroacetyl-amino-5-(3-[3-(bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy)-2-hydroxy-propyl-N-(trifluoroacetyl)-amino]-propyl)-6-phenyl-phenanthridinium Iodid (**22**) wurde unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss in 37 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 417 µl (2.34 mmol, 3 eq) über Molsieb getrocknetem DIPEA versetzt. Nach Zugabe von 268 µl (1.17 mmol, 1.5 eq) wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels ESI-MS kontrolliert. War noch Edukt vorhanden, gab man noch 179 µl (0.78 mmol, 1eq) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropyl-chlorophosphoramidit und 139 µl (0.78 mmol, 1eq) DIPEA zu und rührte weiter 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die organische Phase wurde einmal mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach dreimaligem Koevaporieren mit Diethylether wurde das Phosphoramidit am Hochvakuum getrocknet. Man nahm vollständigen Umsatz an und stellte nach 2 h Trocknen im Vakuum eine 0.2 M Lösung des Phosphoramidits (**22**) in abs. Acetonitril (3.8 ml) her, die unmittelbar für die Nukleotidsynthese verwendet wurde.

ESI-MS: m/z (%) 1207.3 (100) $[M]^+$, 303.4 (64) $[DMT]^+$.

7.3.3 Darstellung des Phenothiazin-Phosphoramidits

Synthese von 3-Brom-10-methylphenothiazin (**23**)



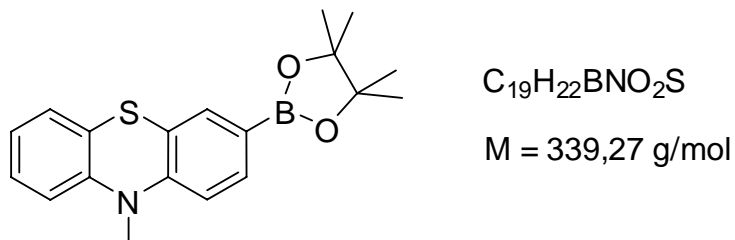
In 37 ml Essigsäure wurden 610 mg (15.3 mmol) Natriumhydroxid gelöst. Unter Lichtschutz wurden 1.07 g (5 mmol) 10-Methylphenothiazin (**15**) in 10 ml Dichlormethan gelöst und zugegeben und auf 5 °C gekühlt. Eine Lösung von 0.35 ml Brom (7 mmol, 1.4 eq) in 5 ml Essigsäure wurde über 15 Minuten langsam zugetropft. Nach 45 Minuten wurde eine Lösung von 700 mg Natriumdithionit in 10 ml Wasser zugegeben. Die trübe, schwach gelbliche Lösung wurde zur Trockne eingeeengt, in 50 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 % Natriumhydrogencarbonatlösung bis zur Beendigung der Gasblasenbildung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan gelöst, an Kieselgel adsorbiert und über Flash-Chromatographie (Hexan/ Essigester 20:1) gereinigt. Man erhielt 979 mg (3.35 mmol, 67%) eines weißen Feststoffes.

DC (Hexan/ Essigester 6:1) $R_f = 0.5$.

ESI-MS: m/z (%) 291 (98), 293 (100) $[M]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.23$ (m, 2H), 7.17 (m, 1H), 7.11 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.79 (m, 1H), 6.62 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H), 3.33 (s, 3H, N- CH_3).

Synthese von 10-Methylphenothiazin-3-yl-4,4,5,5-tetramethyldioxa[1.3.2.]borolan (**24**)



In 16 ml abs. Dioxan wurden 2.0 g (6.8 mmol) 3-Brom-10-methylphenothiazin (**23**) gelöst. Es wurden 150 mg (0.2 mmol, 0.03 eq) [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]-palladium(II) chlorid (1:1 Komplex mit Dichlormethan), 2 ml (14 mmol, 2 eq) Pinakolboran und 2.8 ml (20.6 mmol, 3

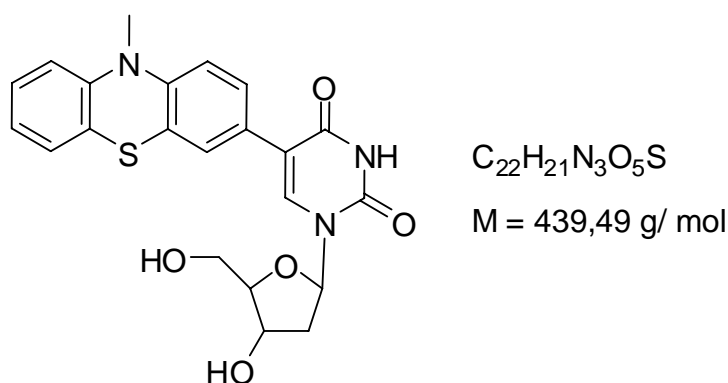
eq) trockenes Triethylamin zugegeben. Es wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 ml gesättigter Natriumchloridlösung versetzt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit je 100 ml Diethylether extrahiert über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Im Anschluss über FC (Hexan/ Diethylether 10:1) gereinigt. Nach dem Trocknen an der Hochvakuumpumpe erhielt man 1.32 g (3.88 mmol, 57 %) an einen weißen Feststoff.

DC (Hexan/ Essigester 8:1) $R_f = 0.19$.

ESI-MS: m/z (%) 339 (100) $[M]^+$, 340 (75) $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.56$ (1H), 7.49 (1H), 7.17 (1H), 7.11 (1H), 6.93 (1H), 6.85-6.80 (m, 2H), 3.70 (s, 3H, N- CH_3), 1.31 (s, 12H, CH_3).

Synthese von 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**25**)



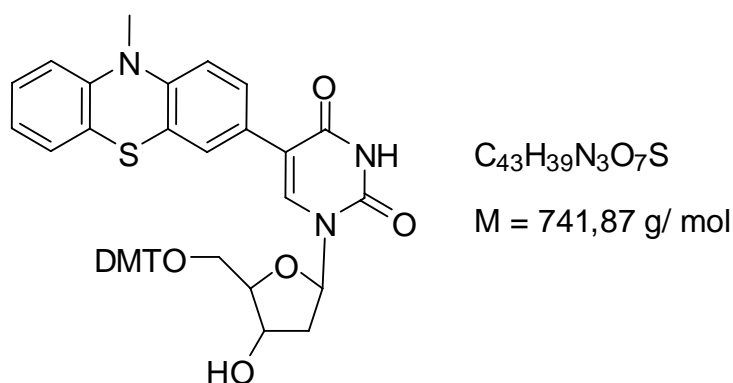
Eine Mischung aus 60 ml Wasser und 60 ml Tetrahydrofuran wurde 30 Minuten mit Stickstoff durchspült. 514 mg (1.45 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin und 604 mg (1.78 mmol, 1.2 eq) 10-Methylphenothiazin-3-yl-4,4,5,5-tetramethyldioxa[1.3.2.]borolan (**24**) wurden zugesetzt. Man gab 119 mg (0.16 mmol, 0.11 eq) [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]-palladium(II) chlorid (1:1 Komplex mit Dichlormethan) zu. Die Lösung wird mit 50 ml Methanol und 1.13 g (28.3 mmol, 19.5 eq) Natriumhydroxid versetzt und anschließend 24 h bei 65 °C gerührt. Die abgekühlte Mischung wurde mit 1 M HCl neutralisiert, filtriert und eingengt. Die verbliebene wässrige Lösung wurde dreimal mit je 40 ml Essigester extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde über FC (Dichlormethan/Aceton 4:1, dann Essigester/Methanol 10:1) gereinigt.

DC (Essigester/ Methanol/ Wasser 12:2:1) $R_f = 0.69$.

ESI-MS: m/z (%) 439 (100) $[M]^+$, 323 (75) $[M+H-C_5H_9O_3]^+$.

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.12$ (s, 1H, 5-H), 7.36 (m, 2H, Ptz-H), 7.20 (m, 1H, Ptz-H), 7.14 (m, 1H, Ptz-H), 6.94 (m, 3H, Ptz-H), 6.20 (t, 1H, 1'-H), 5.24 (br, 1H, 3'-OH), 5.10 (br, 1H, 5'-OH), 4.27 (m, 1H, 3'-H), 3.79 (m, 1H, 4'-H), 3.59 (m, 2H, 5'-H), 3.31 (s, 3H, N-CH₃), 2.18 (m, 2H, 2'-H).

Synthese von 5'-O-Dimethoxytrityl-5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (26)

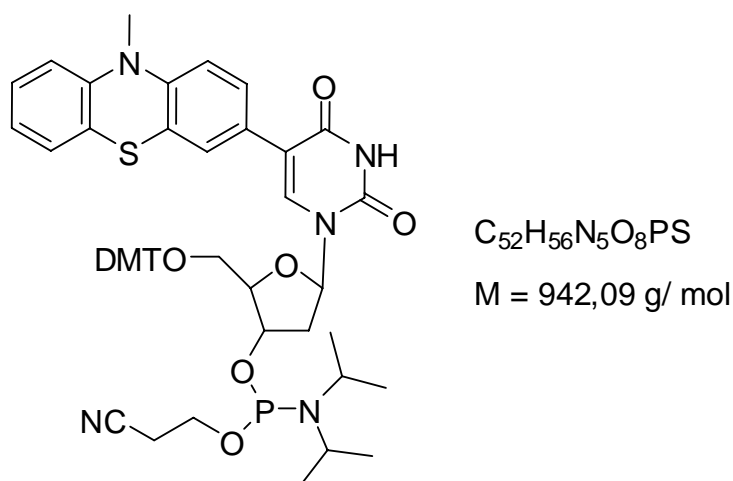


288 mg (0.66 mmol) 5-(10-Methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**25**) wurden mit je 10 ml abs. Pyridin koevaporiert. Es wurden 10 ml abs. Pyridin und 407 mg (1.2 mmol, 1.8 eq) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde 1 ml Methanol zugegeben und weitere 1 Stunde gerührt. Anschließend das Rohprodukt eingeeengt und über FC (Dichlormethan/ Aceton 4:1 und 1% Pyridin, dann Essigester/ Methanol 10:1 und 1 % Pyridin) gereinigt. Man erhielt 216 mg (0.34 mmol, 53 %) an gelb-orangen Pulver.

DC (Essigester/ Methanol/ Wasser 12:2:1) $R_f = 0.85$.

ESI-MS: m/z (%) 741 (100) $[M]^+$, 303 (70) $[DMT]^+$.

1H -NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 11.56$ (s, 1H, N-H), 7.63 (s, 1H, 5-H), 7.31 (m, 2H, DMT), 7.4-7.22 (m, 8H, Ptz, DMT), 7.11-7.06 (m, 3H, Ptz), 6.95 (m, 2H, Ptz), 6.73 (m, 4H, DMT), 6.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ptz), 6.22 (dd, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1'-H), 5.33 (br, 1H, 3'-OH), 4.28 (m, 1H, 3'-H), 3.94 (m, 1H, 4'-H), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (s, 3H, N-CH₃), 3.18 (m, 1H, 5'-H), 3.12 (m, 1H, 5'-H), 2.36 (m, 1H, 2'-H), 2.22 (m, 1H, 2'-H).

Synthese von 5'-O-Dimethoxytrityl-5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin-3'-O-[(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl]-phosphoramidit] (27)

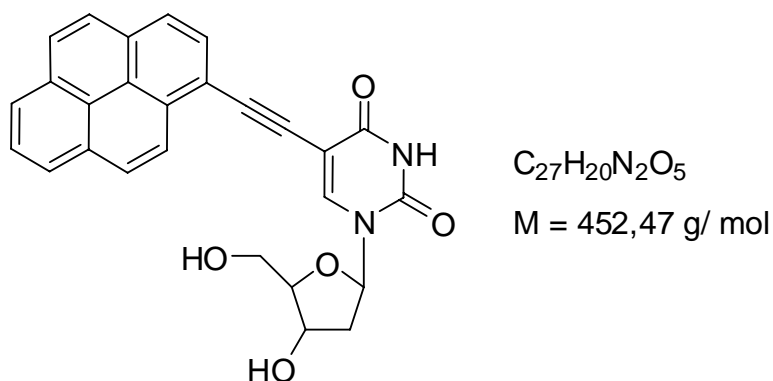
102 mg (0.137 mmol) 5'-O-Dimethoxytrityl-5-(10-methylphenothiazin-3-yl)-2'-desoxyuridin (**26**) wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und mit 56 μl (0.4 mmol, 2.9 eq) Triethylamin versetzt. Nach 15 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurden 80 μl (0.35 mmol, 2.6 eq) 2-Cyanoethyl)-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben und anschließend für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mit frischer, gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung abgebrochen und gewaschen. Die organische Phase wurde sofort über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt und am Hochvakuumpumpe getrocknet. Man nahm vollständigen Umsatz an und stellte eine 0.1 M Lösung des Phosphoramidits **27** in 1.4 ml abs. Acetonitril her, die unmittelbar für die Oligonukleotidsynthese verwendet wurde.

DC (Essigester/ Methanol/ Wasser 12:2:1) $R_f = 0.74$.

ESI-MS: m/z (%) 941 (100) $[M]^+$, 303 (86) $[DMT]^+$.

7.3.4 Darstellung des Pyren-Phosphoamidits

Synthese von 2'-Desoxy- 5-(1-pyrenylethynyl)-uridin (28)



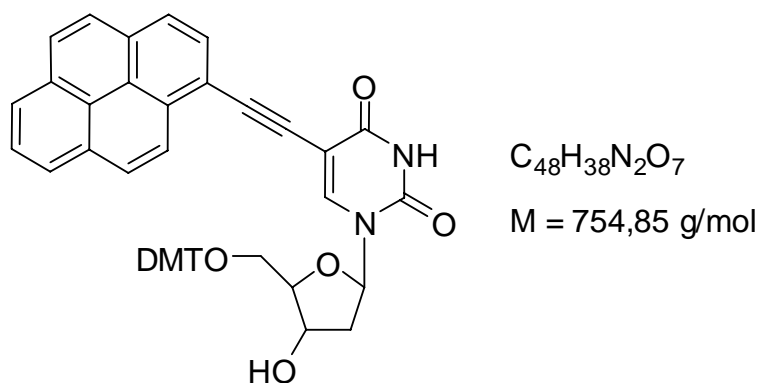
500 mg (1.41 mmol) 5-Iod-2'-desoxyuridin (**29**) wurden mit 470 mg (2.12 mmol, 1.5 eq.) 1-Ethynylpyren (**30**) unter Argon versetzt und in 15 ml DMF suspendiert. Nach Zugabe von 280 µl (3 eq.) Triethylamin, 39.3 mg (0.141 mmol, 0.1 eq.) [1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen]-palladium(II)-chlorid-Methylenchlorid-Komplex (1:1) und 26.5 mg (0.141 mmol, 0.1 eq.) Kupfer(I)-iodid erhielt man gelbgrüne trübe, fluoreszierende Lösung. Diese Lösung wurde dann für weitere 5 Minuten mit Argon behandelt. Danach ließ man für 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Man erhielt einen grün-braunen, trüben, fluoreszierenden Niederschlag, der eingeeengt wurde. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in 200 ml Dichlormethan aufgenommen und je drei mal mit 200 ml 3 %-iger EDTA-Lösung und bidest. Wasser intermittierend gewaschen. Danach wurde die organische Phase zuerst eingeeengt und anschließend mit FC (1-10 % Methanol/ Dichlormethan) gereinigt. Man erhielt 440 mg (69 %) eines hell-grünen Feststoffes (**28**).

DC (Dichlormethan/ Methanol 10:1) $R_f = 0.6$

ESI- MS: m/z (%) 452 (25) $[M]^+$.

¹H- NMR (250 MHz, DMSO- d_6 / CDCl₃ 1:1): δ = 11.75 (br. 1H, NH), 8.63-8.03 (m, 10 H, Ar_{py}H), 8.54 (s, 1H, H-6), 6.16 (s, 1H, H-1'), 5.24 (d, 1H, 3'-OH), 5.21 (t, 1H, 5'-OH), 4.29 (m, 1H, H-3'), 3.83 (m, 1H, H-4'), 3.74-3.59 (m, 2H, H-5'), 2.28-2.16 (m, 2H, H-2')

¹³C- NMR (62.5 MHz, DMSO): δ = 161.9, 149.7, 144.1, 131.1, 131.0, 130.7, 129.2, 128.5, 127.4, 127.0, 126.1, 125.2, 125.1, 123.9, 123.6, 117.2, 98.7, 91.4, 88.7, 87.9, 85.2, 70.1, 61.1, 30.9.

Synthese von 2'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenylethynyl)-uridin (31)

360 mg (0.79 mmol) 2'-Desoxy- 5-(1-pyrenylethynyl)-uridin (**28**) wurden mit 294 mg (0.87 mmol, 1.1 eq.) Dimethoxytritylchlorid in 30 ml Pyridin suspendiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 5 Minuten mit Argon behandelt. Danach ließ man für 24 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Die Reaktion wurde mit 1 ml Methanol gestoppt und für weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Man erhielt eine braune, fluoreszierende Reaktionsmischung, die eingeengt wurde. Anschließend wurde die Reaktionsmischung in 200 ml Dichlormethan aufgenommen und je drei mal mit 200 ml 3%-iger EDTA-Lösung und Wasser abwechselnd gewaschen. Dann wurde organische Phase eingeengt und anschließend mit FC (1-7 % Methanol/ Dichlormethan) gereinigt. Man erhielt 262 mg (40 %) eines dunkelgelben Feststoffes (**31**).

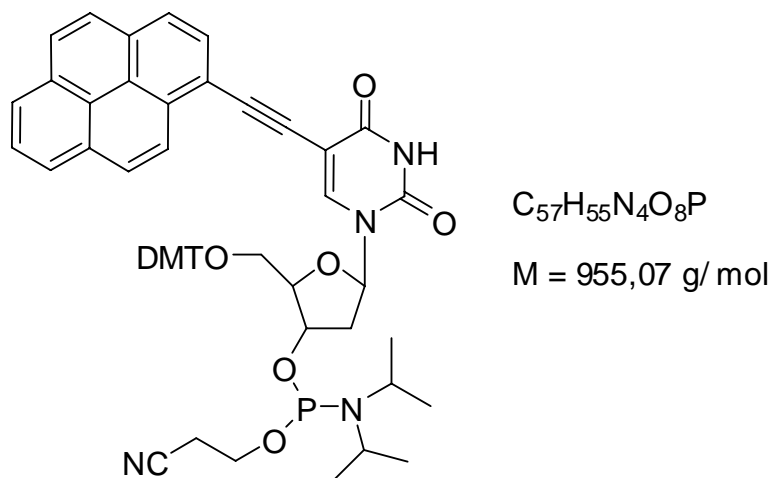
DC (Dichlormethan/ Methanol 10:1) R_f = 0.44.

ESI- MS: m/z (%) 1531 (25) [2M+Na]⁺, 754 (20) [M+Na]⁺.

¹H- NMR (250 MHz CDCl₃) δ = 8.71 (br.1H, NH- 6), 8.41 (d, 1H, Ar_{py}H), 8.3 (s, 1H, H-6), 8.14 (t, 2H, Ar_{py}H), 8.05 (d, 1H, Ar_{py}H), 7.98 (dd, 2H, Ar_{py}H), 7.89 (t, 2H, Ar_{py}H), 7.56 (d, 1H, Ar_{py}H), 7.46 (d, 2H, DMT- H) 6.30 (t, 1H, H- 1'), 5.20 (br, 1H, H-3'), 4.42 (br, 1H, H-4'), 3.82- 3.71 (m, 2H, H- 5'), 2.35- 2.22 (m, 2H, H-2'), 2.12 (s, 2H, OH)

¹³C- NMR (62.5 MHz CDCl₃): δ = 161.4, 158.5, 149.3, 144.4, 141.6, 135.4, 131.9, 131.2, 131.1, 131.0, 130.0, 129.9, 129.5, 128.4, 128.2, 128.1, 127.9, 127.1, 127.0, 126.1, 125.6, 125.4, 124.1, 117.0, 113.3, 101.0, 93.4, 87.1, 86.7, 86.5, 72.5, 63.4, 55.0, 41.7.

2'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenylethynyl)-uridin-3'-O-(cyanoethyl-N,N'-diisopropyl)-phosphoramidit (32)



Unter Luftausschluß wurden 120 mg (0.15 mmol) 2'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-(1-pyrenylethynyl)-uridin (**31**) in 5 ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 83 µl (0.6 mmol, 4 eq.) abs. Triethylamin versetzt. Nach 15 Minuten. wurden unter Argon 57 µl (0.195 mmol, 1.3 eq.) Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-N,N'-diisopropylamid-chlorid dazugegeben. Die hellgelbe Reaktionslösung wurde für 45 Minuten. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 20 ml Dichlormethan verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde mit frischer gesättigter NaHCO₃-Lösung extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Man erhielt 143 mg (99 %) eines dunkelgelben Feststoffes (**32**).

DC (Dichlormethan/ Methanol 10:1) R_f = 0.65.

ESI-MS: m/z (%) 954 (100) [M]⁺, 303 (80) [DMT]⁺.

7.4 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden

7.4.1 Allgemeines

DNA-Festphasesynthese und Aufarbeitung

Die Oligonukleotide wurden im Synthesizer auf CPG-Säulen, soweit nicht anders angegeben, nach Standardprotokollen synthetisiert. Am Ende der Synthese wurde die 5'-terminale DMT-Schutzgruppe entschützt. Das CPG-Material wurde in ein Eppendorf Gefäß überführt. Die Entschützung und Abspaltung der unmodifizierten Oligonukleotide vom polymeren Träger, mit 500 Å Porengröße und 1 µM Belegung, erfolgte mit 700 µl conc. NH₃ entweder bei Raumtemperatur über 24 h oder bei 60 °C über 10 h in einem Heizblock. Die Thio-dU-modifizierten Stränge wurden nach Herstellerangaben, bei Raumtemperatur über 24 h in 700 µl 50 mM NaSH in conc. NH₃, entschützt.^[96] Der Ammoniak wurde in der *Speed-Vac* bei 100 mbar und 35°C über 20 Minuten entfernt. Die wässrige Roh-DNA wurde lyophilisiert, resuspendiert und mittels HPLC getrennt.

Die modifizierten und kommerziellen Phosphoramidite wurden in Acetonitril (amidite diluent) aufgenommen und in den Syntheseautomaten eingesetzt. Der Ethidium-Phosphoramidit wurde analog zur Literatur verwendet.^[97] Die Oligonukleotide mit lichtempfindlichen Nukleotiden wurden unter Lichtausschluß gehalten und bei -32°C gelagert. Für die Messungen von Oligonukleotiden wurde, bei Phenothiazin- und Thiouridin-modifizierten Oligonukleotiden anstatt 250 mM NaCl der 100 mM NaAcetat-Puffer verwendet.

Kupplungsprotokolle

Der Synthesizer fördert Flüssigkeiten aus den Reservoirs in Pulsen zu je 16 µl durch die Reaktionsgefäße. Ein Kupplungsprotokoll besteht aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer in Sekunden des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 bedeutet ein schnellstmögliche Durchpumpen des Reagenses. Zur Synthese von unmarkierter DNA wurde das Standardprotokoll verwendet. Zur Synthese von markierten DNA-Strängen wurden nach modifizierten Kupplungsprotokollen mit verlängerter Kupplungszeit synthetisiert (s. Tabelle 7-4). Das modifizierte Kupplungsprotokoll entstand durch die Änderung des Standardprotokolls im Bereich „\$ Coupling“.

Tabelle 7-4: Übersicht über die verwendeten modifizierten Nukleotide und dessen Kupplungszeit:

eingesetzte Nukleotide	Kupplungszeit und Kupplungsprotokoll
Br-dU (33)	Standardprotokoll
Ethidium-Baustein (21)	60 Minuten (Kupplungsprotokoll 2)
Indol-Nukleotid ^a (18)	15 Minuten (Kupplungsprotokoll 1)
Indol-Nukleotid ^b (18)	60 Minuten (Kupplungsprotokoll 2)
Indolsulfonamid-Nukleotid (7)	60 Minuten (Kupplungsprotokoll 2)
Ptz-dU (25)	15 Minuten (Kupplungsprotokoll 1)
Py-≡-dU (28)	15 Minuten (Kupplungsprotokoll 1)
Thio-dU (34)	Standardprotokoll

a = Einfach modifizierter Strang

b = Doppeleinbau mit Ethidium-Nukleotid

Kupplungsprotokoll 1:

```

$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      1      0 "Event out ON"
  0 /*Default          */ WAIT     0    1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      1      1 "START data collection"
 16 /*Dblk             */ PULSE    10     0 "Dblk to column"
 16 /*Dblk             */ PULSE    50    49 "Deblock"
 38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE    40     0 "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      0      1 "STOP data collection"
 38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE    40     0 "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      2      0 "Event out OFF"

$Coupling
  1 /*Wsh               */ PULSE     5     0 "Flush system with Wsh"
  2 /*Act               */ PULSE     6     0 "Flush system with Act"
 23 /**6 + Act         */ PULSE     7     0 "Monomer + Act to column"
 23 /**6 + Act         */ PULSE     2    75 "Couple monomer"
  2 /*Act               */ PULSE     4   300 "Weiterkuppeln!"
  1 /*Wsh               */ PULSE     7  525 "MEHR Ausbeute!"
  1 /*Wsh               */ PULSE     8     0 "Flush system with Wsh"

$Capping
 12 /*Wsh A             */ PULSE    20     0 "Flush system with Wsh A"
 13 /*Caps              */ PULSE     8     0 "Caps to column"
 12 /*Wsh A             */ PULSE     6    15 "Cap"
 12 /*Wsh A             */ PULSE    14     0 "Flush system with Wsh A"

$Oxidizing
 15 /*Ox                */ PULSE    15     0 "Ox to column"
 12 /*Wsh A             */ PULSE    15     0 "Flush system with Wsh A"

$Capping
 13 /*Caps              */ PULSE     7     0 "Caps to column"
 12 /*Wsh A             */ PULSE    30     0 "End of cycle wash"

```

Abbildung 7.1: Kupplungsprotokoll 1 mit 15 Minuten verlängerter Kupplungszeit. Erläuterungen: **Dblk:** 3% Dichloressigsäure in Dichlormethan, **Wsh:** Acetonitril, **Act:** 0.45 M Tetrazol in Acetonitril, **Caps:** Acetanhydrid in THF/Pyridin (**CapA**) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (**CapA**), **Ox:** Oxidazer (Ios in Wasser/ THF/ Pyridin).

Kupplungsprotokoll 2:

```

$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      1      0 "Event out ON"
0 /*Default */ WAIT      0      1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      1      1 "START data collection"
16 /*Dblk */ PULSE     10      0 "Dblk to column"
16 /*Dblk */ PULSE     50      49 "Deblock"
38 /*Diverted Wsh A */ PULSE     40      0 "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA      0      1 "STOP data collection"
38 /*Diverted Wsh A */ PULSE     40      0 "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA      2      0 "Event out OFF"

$Coupling
1 /*Wsh */ PULSE      5      0 "A Flush system with Wsh"
2 /*Act */ PULSE      7      0 "A Flush system with Act"
23 /*6 + Act */ PULSE      6      0 "A Monomer + Act to column"
23 /*6 + Act */ PULSE      2     500 "A Couple monomer mod.1"
2 /*Act */ PULSE      3     300 "A Couple monomer mod.2"
23 /*6 + Act */ PULSE      3     50 "A Couple monomer mod.3"
23 /*6 + Act */ PULSE      1     500 "A Couple monomer mod.4"
2 /*Act */ PULSE      3     300 "A Couple monomer mod.5"
1 /*Wsh */ PULSE      7     200 "A Couple monomer mod.6"
2 /*Act */ PULSE      7      0 "B Flush system with Act"
23 /*6 + Act */ PULSE      6      0 "B Monomer + Act to column"
23 /*6 + Act */ PULSE      2     500 "B Couple monomer mod.1"
2 /*Act */ PULSE      3     300 "B Couple monomer mod.2"
23 /*6 + Act */ PULSE      3     50 "B Couple monomer mod.3"
23 /*6 + Act */ PULSE      1     500 "B Couple monomer mod.4"
2 /*Act */ PULSE      3     300 "B Couple monomer mod.5"
1 /*Wsh */ PULSE      7     200 "B Couple monomer mod.6"
1 /*Wsh */ PULSE     30      0 "B Flush system with Wsh"

$Capping
12 /*Wsh A */ PULSE     20      0 "Flush system with Wsh A"
13 /*Caps */ PULSE      8      0 "Caps to column"
12 /*Wsh A */ PULSE      6     15 "Cap"
12 /*Wsh A */ PULSE     14      0 "Flush system with Wsh A"

$Oxidizing
15 /*Ox */ PULSE     15      0 "Ox to column"
12 /*Wsh A */ PULSE     15      0 "Flush system with Wsh A"

$Capping
13 /*Caps */ PULSE      7      0 "Caps to column"
12 /*Wsh A */ PULSE     30      0 "End of cycle wash"

```

Abbildung 7.2: Kupplungsprotokoll 2 mit 60 Minuten verlängerter Kupplungszeit. Erläuterungen: **Dblk:** 3% Dichloressigsäure in Dichlormethan, **Wsh:** Acetonitril, **Act:** 0.45 M Tetrazol in Acetonitril, **Caps:** Acetanhydrid in THF/Pyridin (**CapA**) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (**CapA**), **Ox:** Oxidazer (Ios in Wasser/ THF/ Pyridin).

Modifizierte Duplexe und Gegenstränge

Bei den verwendeten Gegenstränge gilt, dass sie zum modifizierten Strang möglichst Komplementär sind. Für die modifizierten Nukleotiden wurden folgende Gegenbasen verwendet.

Tabelle 7-5: Übersicht über die verwendeten modifizierten Nukleotide und Gegenbasen:

eingesetzte Nukleotide	Gegenbase
Py-≡-dU	dA
Ptz-dU	dA
Thio-dU	dA
Br-dU	dA
Eth-Nukleosidanalogen	dC
In-Nukleotid	dC

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der Stammlösungen vom Oligonukleotide wurde über die optische Dichte bei 260 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient des modifizierten Oligonukleotids wurde durch die Addition aller Koeffizienten der einzelnen Nukleobasen ermittelt und mit einem Faktor 0.9 für die Hypochromizität verrechnet.

Tabelle 7-6: Molare Extinktionskoeffizienten modifizierter Nukleotide in DNA:

Chromophor	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Py-≡-dU	12.7
Ptz-dU	53.2
Thio-dU	4.0
In-Nukleotid	3.9
Is-dU	9.0
Eth-Nukleosidanalogen	45.2

Hybridisierung von DNA-Duplexen

Der modifizierte Einzelstrang wurde mit 1.2 eq des komplementären Gegenstrangs versetzt um eine quantitative Duplexbildung zu gewährleisten. In einem 10 mM NaP_i (pH 7) wurden die Einzelstränge 10 Minuten bei 90 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Schmelztemperaturmessungen

Für die Schmelzpunktmessungen wurden Duplexlösungen in 10 mM NaP_i und 250 mM NaCl frisch hybridisiert. Die Messung erfolgte in einem Cary 100 UV-Vis-Spektrometer bei 260 nm. Die Konzentration der Duplexlösungen soll größer sein als 0.1, der Wert von der optischen Dichte, bei der verwendeten Wellenlänge (meist zw. 2.5 µM bzw. 5 µM).

7.4.2 Verwendete Oligonukleotidsequenzen

Indolmodifizierte Oligonukleotide (s. Kapitel 3-1)

I1 5'-GCA-GTC-TT **I**-TTC-ACT-GA-3'
C9 3'-CGT-CAG-AAC-AAG-TGA-CT-5'

I = Indol-Nukleotid

I1 5'-GCA-GTC-TT **I**-TTC-ACT-GA-3'
C10 3'-CGT-CAG-AAT-AAG-TGA-CT-5'

I1 5'-GCA-GTC-TT **I**-TTC-ACT-GA-3'
C11 3'-CGT-CAG-AAA-AAG-TGA-CT-5'

I1 5'-GCA-GTC-TT **I**-TTC-ACT-GA-3'
C12 3'-CGT-CAG-AAG-AAG-TGA-CT-5'

I2 5'-GCA-GTC-TA **I**-ATC-ACT-GA-3'
C5 3'-CGT-CAG-ATC-TAG-TGA-CT-5'

I2 5'-GCA-GTC-TA **I**-ATC-ACT-GA-3'
C6 3'-CGT-CAG-ATT-TAG-TGA-CT-5'

I2 5'-GCA-GTC-TA **I**-ATC-ACT-GA-3'
C7 3'-CGT-CAG-ATA-TAG-TGA-CT-5'

I2 5'-GCA-GTC-TA **I**-ATC-ACT-GA-3'
C8 3'-CGT-CAG-ATG-TAG-TGA-CT-5'

I3 5'-GCA-GTC-TG **I**-GTC-ACT-GA-3'
C13 3'-CGT-CAG-ACC-CAG-TGA-CT-5'

I4 5'-GCA-GTC-TC **I**-CTC-ACT-GA-3'
C14 3'-CGT-CAG-AGC-GAG-TGA-CT-5'

Indol- und ethidiummodifizierte Oligonukleotide (s. Kapitel 3-2)

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C15 5'-GTC-AGT-CAA-CTG-CAT-GC-3'

E = Ethidium-Nukleosidanalogen**I** = Indol-Nukleotid

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C16 5'-GTC-AGT-CTA-CTG-CAT-GC-3'

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C17 5'-GTC-AGT-CGA-CTG-CAT-GC-3'

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C18 5'-GTC-AGT-CCA-CTG-CAT-GC-3'

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C19 5'-GTC-AGT-CAT-CTG-CAT-GC-3'

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C20 5'-GTC-AGT-CAG-CTG-CAT-GC-3'

E1 3'-CAG-TCA-ETT-IAC-GTA-CG-5'
 C21 5'-GTC-AGT-CAC-CTG-CAT-GC-3'

Indolsulfonamidmodifiziertes Oligonukleotid (s. Kapitel 3-3)

Is1 3'-CAG-TCA-GTT-IsAC-GTA-CG-5'
 C15 5'-GTC-AGT-CAA-CTG-CAT-GC-3'

Is = Sulfonamid-Indol-Nukleotid**Phenothiazin-, thiouridin- und bromuridinmodifizierte Oligonukleotide (s. Kapitel 4)**

Pz1 5'-CAG-TCA-PzTS-TBT-ACT-GAC-3'
 T1 3'-GTC-AGT-AAS-AAA-TGA-CTG-5'

Pz = Ptz-dU**S** = Thio-dU**B** = Br-dU

Pz2 5'-TCA-GTC-A**Pz**T-**S****B**T-ACT-GAC-3'

T2 3'-AGT-CAG-TAA-**S**AA-TGA-CTG-5'

Pz3 5'-TCA-GTC-A**Pz**A-**S****B**T-ACT-GAC-3'

T3 3'-AGT-CAG-TA**S**-AAA-TGA-CTG-5'

Pz4 5'-TCA-GTC-A**Pz****S**-T**B**T-ACT-GAC-3'

T3 3'-AGT-CAG-TA**S**-AAA-TGA-CTG-5'

C22 3'-TGC-ACG-TAG-AGA-TGC-ACG-T-5' **Referenzstrang**

Pyrenmodifizierte Oligonukleotide (s. Kapitel 5)

Py1 3'-ACG-TGC-ATT-**Py**TT-ACG-TGC-A-5'

C1 5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'

Py = Py-in-dU

Py2 3'-ACG-TGC-ATT-**Py Py**T-ACG-TGC-A-5'

C1 5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'

Py3 3'-ACG-TGC-AT**Py-Py Py**T-ACG-TGC-A-5'

C1 5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'

Py4 3'-ACG-TGC-AT**Py-Py Py Py**-ACG-TGC-A-5'

C1 5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'

Py5 3'-ACG-TGC-A**Py Py-Py Py Py**-ACG-TGC-A-5'

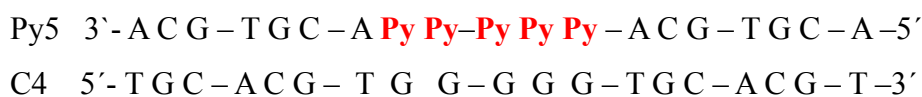
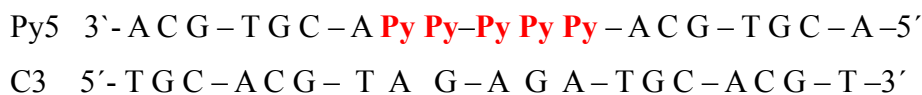
C1 5'-TGC-ACG-TAA-AAA-TGC-ACG-T-3'

Py5 3'-ACG-TGC-A**Py Py-Py Py Py**-ACG-TGC-A-5'

Py6 5'-TGC-ACG-T**Py Py-Py Py Py**-TGC-ACG-T-5'

Py5 3'-ACG-TGC-A**Py Py-Py Py Py**-ACG-TGC-A-5'

C2 5'-TGC-ACG-TAA-GAA-TGC-ACG-T-3'



7.4.3 Synthese und Charakterisierung von indolmodifizierten Oligonukleotiden

Der Einbau des Indol-Phosphoramidits **3** erfolgte nach dem Kupplungsprotokoll mit verlängerter Kupplungszeit von 15 Minuten und zusätzlichen Waschschritten (s. Abbildung 7-1 und Tabelle 7-4). Bei der Abspaltung wurde auf Lichtausschluss geachtet.

Tabelle 7-7: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten:

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
I1	5140.08	5138.40	154.8
I2	5158.11	5157.20	166.7
I3	5190.10	5189.20	160.0
I4	5110.10	5109.2	148.5

Tabelle 7-8: Schmelztemperaturen bei 260 nm von 2.5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl:

DNA	SmP [°C]	DNA	SchmP [°C]
I1/C9	52	I2/C5	51
I1/C10	52.5	I2/C6	53
I1/C11	53	I2/C7	54
I1/C12	52	I2/C8	54
I3/C13	57	I4/C14	53.4

Der Einbau des sulfonamidgeschützten Indolnukleotids **7** erfolgte nach dem Kupplungsprotokoll 2 (s. Abbildung 7-2, Tabelle 7-4). Bei der Abspaltung erfolgte unter Lichtausschluss.

Tabelle 7-9: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten:

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Is1	5316,0	5317,2	164.5

7.4.4 Synthese und Charakterisierung von ethidium- und indolmodifizierten Oligonukleotiden

Der Einbau von Idol- **3** und Ethidium-Phosphoramidite **22** erfolgte nach dem Kupplungsprotokoll 2 mit verlängerter Kupplungszeit von 60 Minuten und zusätzlichen Waschschritten (s. Abbildung 7-2 und Tabelle 7-4). Bei der Abspaltung wurde auf Lichtausschluss geachtet.

Tabelle 7-10: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten:

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
E1	5327,5	5326,4	194,1
E2	5493,91	5505,2	216,0
E3	5493,91	5477,2	227,9

Tabelle 7-11: Schmelztemperaturen bei 260 nm von 2,5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl:

DNA	SmP [°C]
E1/C15	46
E1/C16	45
E1/C17	45
E1/C18	45
E1/C19	45
E1/C20	52
E1/C21	45

7.4.5 Synthese und Charakterisierung von phenothiazin-, thiouridin und bromuridin-modifizierten Oligonukleotiden

Der Einbau von Ptz-dU-Phosphoramidit (**27**) erfolgte nach dem Kupplungsprotokoll 1 mit verlängerter Kupplungszeit von 15 Minuten und zusätzlichen Waschschritten (s. auch Abbildung 7-1 und Tabelle 7-4). Die Einbauten von kommerziellem Br-dU- (**33**) und Thio-dU-Phosphoramiditen (**34**) erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des DNA-Synthesizers. Die Abspaltung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.^[96]

Tabelle 7-12: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten:

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Pz1	5704.584	5704.4	195.6
Pz2	5704.584	5704.4	195.6
Pz3	5713.595	5713.2	201.5
Pz4	5704.584	5703.6	195.6
T1	5547.195	5548.4	187.6
T2	5547.195	5548.6	187.6
T3	5547.195	5549.2	187.6

7.4.6 Synthese und Charakterisierung von Py≡-dU-modifizierten Oligonukleotiden

Der Einbau von Py≡-dU-Phosphoramidit **32** erfolgte nach dem Kupplungsprotokoll 1 mit verlängerter Kupplungszeit von 15 Minuten und zusätzlichen Waschschritten (s. Abbildung 7-1 und Tabelle 7-4). Bei der Abspaltung wurde auf Lichtausschluss geachtet.

Tabelle 7-13: MALDI-Massen und Extinktionskoeffizienten:

DNA-Strang	ber. Masse [g/mol]	gem. Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Py1	6003.658	6007.673	184.1
Py2	6213.66	6213.487	188.9
Py3	6423.562	6430.036	193.7
Py4	6633.463	6636.5	198.5
Py5	6843.365	6845.558	203.3
Py5'	6825.339	6832.23	191.3

Tabelle 7-14: Schmelztemperaturen bei 260 nm von 2.5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i mit 250 mM NaCl:

DNA	SchmP [°C]
Py1/C1	65
Py2/C1	66
Py3/C1	65
Py4/C1	67
Py5/C1	76
Py5/Py5'	79
Py5/C2	72
Py5/C3	67
Py5/C4	71

8. Literaturverzeichnis

- [1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [3] I. H. G. Collaborators, *National Center for Biotechnology Information* **2001**.
- [4] J. C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304-1351.
- [5] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046.
- [6] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [7] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 1859-1862.
- [8] M. H. Caruthers, A. Barone, S. L. Beaucage, D. Dodds, E. Fisher, L. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Young, *Meth. Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [9] Y. Sun, C.-H. Kiang in *DNA-based Artificial Nanostructures: Fabrication, Properties, and Applications*, Vol. 2 (Hrsg. H. S. Nalwa), American Scientific, Stevenson Ranch, CA, **2005**, S. 224-246.
- [10] D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.* **1962**, 58, 411-415.
- [11] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 53-120.
- [12] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [13] D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [14] H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, DOI: 10.1039/b504754b.
- [15] T. Carell, *Chimia* **1995**, 49, 365-373.
- [16] T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2491-2494.
- [17] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2203-2237.
- [18] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2865- 2869.
- [19] D. H. Blohm, A. Guiseppe-Elie, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 41-47.
- [20] M. C. Pirrung, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1276-1289.
- [21] A. Jung, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 372, 41-42.
- [22] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1623-1633.
- [23] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 7842-7849.
- [24] L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 36-38.
- [25] L. Valis, Ladungstransfer in synthetischer DNA mit Ethidium als Basensurrogat oder pyrenmodifizierten Guanin. Dissertation, TU München, **2007**.
- [26] C. Wanninger-Weiß, Ladungstransfer in DNA mit Indol, Ethidium und Pyren als Fluoreszenzsonden: Synthese, Spektroskopie und Primerverlängerung, Universität Regensburg, **2008**.

- [27] H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 2482-2506.
- [28] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 1871- 1876.
- [29] J. Cadet, P. Vigny in *Bioorganic Photochemistry*, Vol.1 (Ed.: H. Morisson), John Wiley & Sons, N.Y., **1990**, 1.
- [30] Kraft, G.; Kramer, M. *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 1.
- [31] a) Taylor, J.- S. *J. Chem. Ed.* **1990**, 67, 835; b) Taylor, J.- S. *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 76.
- [32] D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [33] S. Kawanashi, Y. Hiraku, S. Oikawa, *Mutation Res.* **2001**, 488, 65-76.
- [34] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [35] S. Steenken, S.V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617-618.
- [36] S.O. Kelley, J.K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 413-425.
- [37] T. Carell, *Nature* **2004**, 431, 217.
- [38] J.M. Essigman, D. Wang, D.A. Kreutzer, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [39] S.O. Kelly, N.M. Jackson, M.G. Hill und J.K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 941.
- [40] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221.
- [41] H.-A. Wagenknecht, *Chemie in unserer Zeit*, **2002**, 36, 318.
- [42] R.A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 811, 265.
- [43] S. O. Kelly, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9861- 9870.
- [44] B. Giese, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 631.
- [45] a) F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, R. M. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51; b) F. D. Lewis, R. L. Letsinger, R. M. Wasielewski, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 159; c) F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, R. M. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14020; d) F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12165, e) F. D. Lewis, X. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, R. M. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4850.
- [46] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51-70.
- [47] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, 412, 318-320.
- [48] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, B. Cohen, M. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7982-7985.
- [49] D. Ly, L. Sani, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 10857- 10864.
- [50] B. Giese, S. Wessely, M. Spormann, U. Lindemann, E. Meggers, M. E. Michel- Beyerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 996-998.
- [51] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, 382, 731- 735.

- [52] G. B. Schuster, *Acc.Chem.Res.* **2000**, 33, 253.
- [53] M. Bixon, J. Jortner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12556-12567.
- [54] G. B. Schuster, U. Landman, *Top. Curr. Chem.* **2004**, Vol. 236, 139-161 „Long-Range Charge Transfer in DNA I“, Springer-Verlag Heidelberg **2004**.
- [55] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6014-6019.
- [56] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1122-1130.
- [57] M. E. Nunez, J. K. Barton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 199-206.
- [58] M. E. Núñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 85-97.
- [59] F. Shao, M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17914- 17919.
- [60] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, 40, 5556-5564.
- [61] S. R. Rajski, S. Kumar, R. J. Roberts, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5615-5616.
- [62] T. T. Williams, D. T. Odom, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9048- 9049.
- [63] M. E. Núñez, K. T. Noyes, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 403-415.
- [64] T. T. Williams, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1840-1841.
- [65] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9083- 9092.
- [66] O. Schiemann, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 7214- 7220.
- [67] E. D. A. Stemp, M. R. Arkin, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2921- 2925.
- [68] K. L. Nguyen, M. Steryo, K. Kurbanyan, K. M. Nowitzki, S. M. Butterfield, S. R. Ward, E. D. A. Stemp, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3585-3594.
- [69] K. D. Copeland, A. M. K. Lueras, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry* **2002**, 41, 12785- 12797.
- [70] P. K. Bhattacharya, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8649- 8656.
- [71] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, S. C. Pulver, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 389-400.
- [72] E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hörmann, A. M. Jonkman, M. E. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, P. F. Barbara, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11458- 11467.
- [73] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, 37, 15933-15940.
- [74] K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7373-7374.
- [75] S. Kanvah, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7341-7344.
- [76] S. M. Gasper, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12762- 12771.
- [77] C.-S. Liu, R. Hernandez, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2877- 2884.
- [78] N. W. Schlientz, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15732- 15733.
- [79] C.-S. Liu, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6098-6102.

- [80] I. M. Abdou, V. Sartor, H. Cao, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6696- 6697.
- [81] L. Sani, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11545-11546.
- [82] A. K. Dotse, E. K. Boone, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6825- 6833.
- [83] S. Kanvah, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11286-11287.
- [84] U. Santhosh, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10986-10987.
- [85] K. Nakatani, I. Saito, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 163-186.
- [86] C. Dohno, I. Saito, Chemical Approaches to Modulating Hole Transport Through DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**; pp 153-174.
- [87] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 416-417.
- [88] C. Dohno, A. Ogawa, K. Nakatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10154- 10155.
- [89] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5066- 5071.
- [90] A. Okamoto, K. Tanaka, K.-i. Nishiza, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5875-5880.
- [91] A. Okamoto, K. Tanaka, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9458- 9463.
- [92] K. Nakatani, T. Yoshida, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2118- 2119.
- [93] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6901-6904.
- [94] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 10041-10045.
- [95] C. Dohno, K. Nakatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14580- 14585.
- [96] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5893- 5894.
- [97] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9681- 9682.
- [98] P. T. Henderson, D. Jones, G. Hampikian, Y. Kan, G. B. Schuster, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 8353-8358.
- [99] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12950- 1295
- [100] B. Giese, E. Meggers, S. Wessely, M. Spormann, A. Biland, *Chimia* **2000**, 54, 547-551.
- [101] B. Giese, S. Wessely, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3490-3491.
- [102] E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 459-462.
- [103] E. Meggers, A. Dussy, T. Schäfer, B. Giese, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 485- 492.
- [104] B. Giese, M. Spichty, S. Wessely, *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 449-453.
- [105] A. Marx, P. Erdmann, M. Senn, S. Körner, T. Jungo, M. Petretta, P. Imwinkelried, A. Dussy, K. J. Kulicke, M. Zehnder, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 1980-1994.
- [106] a) C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, 262, 1025-1029; b) M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 67-115.

- [107] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 352-354.
- [108] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673-676.
- [109] F. D. Lewis, J. Liu, X. Liu, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1026-1028.
- [110] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 45-65.
- [111] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, Dynamics of Photoinitiated Hole and Electron Injection in Duplex DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim **2005**; pp 93-116.
- [112] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8206-8215.
- [113] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10002-10003.
- [114] F. D. Lewis, L. Zhang, X. Liu, X. Zuo, D. M. Tiede, H. Long, G. C. Schatz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14445-14453.
- [115] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, X. Zuo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12729-12731.
- [116] F. D. Lewis, Y. Wu, *J. Photochem. Photobiol. C* **2001**, 2, 1-16.
- [117] F. D. Lewis, R. S. Kalgutkar, Y. Wu, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12346-12351.
- [118] F. D. Lewis, J. Liu, W. Weigel, W. Rettig, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12536-12541.
- [119] F. Lewis, X. Liu, J. Liu, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12037-12038.
- [120] F. D. Lewis, T. Wu, X. Liu, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2889-2902.
- [121] K. Senthilkumar, F. C. Grozema, C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, F. D. Lewis, Y. A. Berlin, M. A. Ratner, L. D. A. Siebbeles, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14894-14903.
- [122] C. R. Treadway, M. G. Hill, J. K. Barton, *Chem. Phys.* **2002**, 281, 409-428.
- [123] E. M. Boon, J. K. Barton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 320-329.
- [124] M. A. O'Neill, J. K. Barton, Sequence-dependent DNA Dynamics: The Regulator of DNA-mediated Charge Transport. In *Charge Transfer in DNA- From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**; pp 27-76.
- [125] S. Delaney, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6475-6483.
- [126] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 158-161.
- [127] K. Fukui, K. Tanaka, M. Fujitsuka, A. Watanabe, O. Ito, *J. Photochem.*

- Photobiol. B* **1999**, 50, 18-27.
- [128] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 16543-16550.
- [129] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14052-14055.
- [130] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, 283, 375-381.
- [131] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 5896-5900.
- [132] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10924-10933.
- [133] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4399-4408.
- [134] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, Spectroscopic Investigation of Charge Transfer in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**; pp 175-196.
- [135] V. Shafirovich, N. E. Geacintov, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 237, 129-157.
- [136] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 8431- 8435.
- [137] V. Y. Shafirovich, S. H. Courtney, N. Ya, N. E. Geacintov, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4920-4929.
- [138] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 137-139.
- [139] W. B. Davis, S. Hess, I. Naydenova, R. Haselsberger, A. Ogrodnik, M. D. Newton, M.- E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2422-2423.
- [140] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 342, 231-238.
- [141] S. Hess, W. B. Davis, A. A. Voityuk, N. Rösch, M. E. Michel-Beyerle, N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko, J. L. P. Lustres, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 452-455.
- [142] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10046-10055.
- [143] K. Kawai, T. Majima, Spectroscopic Investigation of Oxidative Hole Transfer via Adenine Hopping in DNA. In *Charge Transfer in DNA – From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, **2005**; pp 117-132.
- [144] K. Kawai, K. Miyamoto, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 912-915.
- [145] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, N. Ichinose, T. Majim, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12688-12689.
- [146] K. Kawai, H. Yoshida, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127,

13232-13237. 7 Literaturverzeichnis 180

- [147] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6842-6843.
- [148] K. Kawai, T. Majima, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 117-137.
- [149] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9083-9092.
- [150] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4400-4407; b) S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, 40, 5556-5564.
- [151] J. Yoo, S. Delaney, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6640-6641.
- [152] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, R. L. Letsinger, R. Sanishvili, A. Joachimiak, V. Tereshko, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9905- 9906.
- [153] L. Valis, Q. WAng, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, (27), 10192-10195.
- [154] C.A.M. Seidel, A. Schulz, M.H.M. Sauer, *J. Phys.Chem.*, **1996**, 100, 5541.
- [155] S. Stenken, J.P. Telo, H.M. Novais, L.P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4701.
- [156] a) S. Wesolowski, M.L. Leininger, P.N. Pentchev, H.F. Schäfer III, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 4023; b) X.Li, Z. Cai, M.D. Sevilla, *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 1596.
- [157] A. R. Pike, L. H. Lie, R. A. Eagling, L. C. Ryder, S. N. Patole, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 615-617.
- [158] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2002**, 20, 282-286.
- [159] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. d. Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803-10812.
- [160] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 209-215.
- [161] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 770-772.
- [162] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144-146.
- [163] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, 398, 407-410.
- [164] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4128-4158.
- [165] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, 403, 635-638.
- [166] E.C. Friedberg et al., *DNA Repairand Mutagenesis*, ASM Press 2006.
- [167] Bruner et al.: Structural Basis for Recognition and Repair of the Endogenous Mutagen 8-Oxoguanine in DNA *Nature* 403 (**2000**) 859.
- [168] Setlow, R. B. und Carrier, W. L. (1966) *J. Mol. Biol* **1966**, 17, 237-254.
- [169] Kao, J. L., Nadji, S., Taylor, J. S., *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 561-567.
- [170] Smith, C. A., Wang, M., Jiang, N., Che, L., Zhao, X. Taylor, J.-S., *Biochemistry* **1996**, 35, 4146-4154.

- [171] Sancar, G. B., Smith F. W. und Sancar A., *Biochemistry* **1985**, 24, 1849–1855.
- [172] Gindt, Y. M., Vollenbroek, E., Westphal, K., Sackett, H., Sancar, A. und Babcock, G. T., *Biochemistry* **1999**, 38, 3857-3866.
- [173] Heelis, P. F., Kim, S. T., Okamura, T., Sancar, A., *J. Photochem. Photobiol.* **1993**, 17, 219-228.
- [174] Todo, T., Kim, S. T., Hitomi, K., Otsoshi, E., Inui, T., Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, ., Toh, H., Ikenaga, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 764-768.
- [175] Hitomi, K., Kim, S. T., Iwai, S., Harima, N., Otsoshi, E., Ikenaga, M., Todo, T., *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32591-32598.
- [176] Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. und Todo, T., *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 2353-2362.
- [177] S. Porello, S. D. Williams, H. Kuhn, M. L. Michaels, S. S. David, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10684-10692.
- [178] N. V. Bulychev, C. V. Varaprasad, G. Dormán, J. H. Miller, M. Eisenberg, A. P. Grollman, F. Johnson, *Biochem.* **1996**, 35, 13147-13156.
- [179] S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1221-1261.
- [180] H. Sticht, P. Rösch, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1998**, 70, 95-136.
- [181] A. Messner, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yanga, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M.D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 104, 1128-1136.
- [182] Y. Razskazovskii, S.G. Swarts, J.M. Falcone, C. Taylor, M.D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 1460-1467.
- [183] R.F. Anderson, G.A. Wright, *Phys. Chem. Phys. Chem.*, **1999**, 1, 4827-4831.
- [184] a) A. Schwögler, L.T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, 39, 3918; b) C. Behrens, L.T. Burgdorf, A. Schwörgler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, 41, 1763; c) C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 3281.
- [185] a) F.D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S.E. Miller, R.M. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 9905, b) F.D. Lewis, X. Liu, S.E. Miller, R.T. Hayes, R.M. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 11280.
- [186] a) N. Amman, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, 41, 2827; b) N. Amman, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 4877; c) H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 2454; d) C.D. Mitchell, T.L. Netzel, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 1637; e) M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 2498- 2504, f) H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 2558- 2565.

- [187] T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *J. Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 2221.
- [188] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Comm.*, **2003**, 6321.
- [189] N. Rahe, C. Rinn, T. Carell, *Chem. Comm.* **2003**, 2120.
- [190] S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 1302.
- [191] T. Ito, S.E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 11480.
- [192] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1848-1851.
- [193] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 270-274.
- [194] M. Manoharan, K.L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. Netzel, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 17461.
- [195] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1987**, 60, 3865- 3877.
- [196] T. Fiebig, C. Wan, A.H. Zewail, *Chem Phys Chem*, **2002**, 3, 781- 788.
- [197] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, 31, 11620-11625.
- [198] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3656-3660.
- [199] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5361-5362.
- [200] S. V. Kochetkova, E. I. Tishchenko, E. N. Timofeev, I. L. Shehaveleva, V. L. Florentiev, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, 18, 1495-1496; b) E. N. Timofeev, I. P. Smirnov, L. A. Haff, E. I. Tishchenko, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8467-8470.
- [201] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1845-1847.
- [202] J.L. Geddie, I.W. Sutherland, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1994**, 20, 117-129.
- [203] J. Barbaric, Diplomarbeit, TU München, **2005**.
- [204] D. P. Weicherding, *Dissertation* **2000**.
- [205] B. Speiser, *Chem. unserer Zeit* **1981**, 15, (2), 62-67.
- [206] J. Salbeck, *Anal. Chem.* **1993**, 65, (15), 2169-2173.
- [207] a) R.L. Letsinger, M.J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3045- 3046; b) R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 87, 3526- 3527.
- [208] R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149- 2154.
- [209] S.L. Beaucage, M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, **22**, 1859-1862.
- [210] M. Caruthers, A. Barone, S.L. Baeucage, D. Dodds, E. Fisher, L. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Young, *Methods Enzymol.*, **1987**, 154, 287-313.
- [211] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1875-1916.
- [212] D. E. Bergstrom, *Nucleosides Nucleotides* **1982**, 1, (1), 1-34.
- [213] V. Farina, S. I. Hauck, *Synlett* **1991**, (3), 157-159.
- [214] P. Herdewijn, L. Kerremans, P. Wigerinck, F. Vandendreissche, A. V. Aerschot, *Tet.*

- Lett.* **1991**, 32, (34), 4397-4400.
- [215] G. T. Crisp, B. L. Flynn, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, (24), 6614-6619.
- [216] M. Havelkova, M. Hocek, M. Cesnek, D. Dvorak, *Synlett* **1999**, (7), 1145-1147.
- [217] M. Hocek, A. Holy, I. Votruba, H. Dvorakova, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, (9), 1817-1825.
- [218] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- [219] M. Murata, T. Oyama, S. Watanabe, Y. Masuda, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, (1), 164- 168.
- [220] A. Guram, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7901-7902.
- [221] A. Guram, R. A. Rennels, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 1348- 1350.
- [222] a) K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 50, 4467-4470; b) S. Takahashi, Y. Kuroyama, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis* **1980**, 627-630; c) P. Magnus, H. Annoura, T. Harling, *J. Org. Chem.* **1999**, 55, 1709- 1711; d) T.R. Hoye, P.R. Hanson, A.C. Kovalsky, T.D. Ocain, Z. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 9369- 9371; e) G. Sagi, L. Ötvös, S. Ikeda, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1307- 1311.
- [223] K. Sonogashira, *J. Organomet.Chem.*, **2002**, 653, 46- 49.
- [224] S.I. Khan, M.W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 4704- 4705.
- [225] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1-7.
- [226] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochem.* **2000**, 39, 5483-5491.
- [227] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4400-4407.
- [228] J. M. Bollinger, Jr., W. H. Tong, N. Ravi, B. H. Huynh, D. E. Edmondson, J. Stubbe, *J.Am.Chem.Soc.* **1994**, 116, 8024.
- [229] P. Norlund, H. Eklund, *J.Mol.Biol.* **1993**, 232, 123.
- [230] M. Sahlin, G. Lassmann, S. Pötsch, A. Slaby, B.-M. Sjöberg, A. Gräslund, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 11699.
- [231] M. R. DeFelippis, D. P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 3416-3419.
- [232] W. Wang, W. Wan, H.-H. Zhou, S. Niu, and A.D.Q. Li, *J.Am.Chem.Soc.* **2003**, 125, 5248-5249.
- [233] M. R. Rajeswari, T. Montenay-Garestier, C. Helene, *Biochem.* **1987**, 26, 6825-6831.
- [234] M. R. Rajeswari, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, 14, 25-30.
- [235] C. Otto, F. F. M. DeMul, J. Greve, *Biopolymers* **1987**, 26, 1667-1689.
- [236] G. C. King, J. E. Coleman, *Biochem.* **1987**, 26, 2929-2937.

- [237] J. R. Casas-Finet, N.-I. Jhon, A. H. Maki, *Biochem.* **1988**, 27, 1172-1178.
- [238] D. H. H. Tsao, J. R. Casas-Finet, A. H. Maki, J. W. Chase, *Biophys. J.* **1989**, 55, 927- 936.
- [239] M. Suzuki, *Nature* **1990**, 344, 562-565.
- [240] C. Robledo-Luigi, W. D. Wilson, E. Pares, M. Vera, C. S. Martinez, D. Santiago, *Biopolymers* **1991**, 31, 907-917.
- [241] P. Ilich, F. G. Preudergast, *Biopolymers* **1992**, 32, 667-694.
- [242] E. Mayer-Enthart, P. Kaden, H.-A. Wagenknecht, *Biochem.* **2005**, 44, 11749-11757.
- [243] A. Harriman, G. R. Millward, P. Neta, M. C. Richoux, J. M. Thomas, *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 1286-1290.
- [244] I. Guilford Jones, V. Malba, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5776-5782.
- [245] J. Stubbe, W. A. van der Donk, *Chemical Reviews* **1998**, Vol. 98, No. 2, 705- 762.
- [246] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1623-1633.
- [247] D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbel, E. Robinson, M. Mittman, M. S. Morris, N.P. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander, *Science* **1998**, 280, 1077.
- [248] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, 234, 177.
- [249] A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 33.
- [250] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 505-508.
- [251] a) A.-C. Syvänen, *Nature Reviews Genetics* 2, **2001**, 930-942; b) Wallace, R. B. *Nucleic Acids Res.* **1979**, 6, 3543-3557.
- [252] a) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; b) <http://biowww.net/detail-681.html>
- [253] Conner, B. J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 278-282.
- [254] Mir, K. U. & Southern, E. M. *Nature Biotechnol.* **1999**, 17, 788-792.
- [255] Hacia, J. G. et al., *Genome Res.* **1998**, 8, 1245-1258.
- [256] Griffin, T. J., Tang, W. & Smith, L. M. *Nature Biotechnol.* **1997**, 15, 1368-1372.
- [257] Ross, P. L., Lee, K. & Belgrader, P. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4197-4202.
- [258] Orum, H., Jakobsen, M. H., Koch, T., Vuust, J. & Borre, M. B. *Clin. Chem.* **1999**, 45, 1898-1905.
- [259] K. U. Mir, E.M. Southern, *Nat. Biotechnol.* 1999, 17(8), 788- 792.
- [260] Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. *PCR Methods Appl.* **1995**, 4, 357-362.
- [261] Livak, K. J. *Genet. Anal.* **1999**, 14, 143-149.

- [261] Nikiforov, T. T. *et al. Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4167–4175.
- [262] a) Gerry, N. P. *et al. J. Mol. Biol.* **1999**, 292, 251–262; b) Iannone, M. A. *et al. Cytometry* **2000**, 39, 131–140.
- [263] Barany, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 189–193.
- [264] Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. & Hood, L. *Science*, **1988**, 241, 1077–1080.
- [265] Grossman, P. D. *et al. Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4527–4534.
- [266] Khanna, M. *et al. Oncogene* **1999**, 18, 27–38.
- [267] Y. Zu, and E. T. Kool, *Nucleic Acid Research*, **1999**, Vol.27, 875–881.
- [268] P. Hagenbuch, E. Kervio, A. Hochgesand, U. Plutowski, and C. Richert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 6588 – 6592.
- [269] N. Amann. Synthese von Ethidium- und Pyren-modifizierten Oligonukleotiden und deren Einsatz bei der Untersuchung des Ladungstransfers durch die DNA. Dissertation, TU München, **2004**.
- [270] H.-A. Wagenknecht, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, accepted.
- [271] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Röglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Analytical Biochemistry*, Volume 375, Issue 2, **2008**, 318–330.
- [272] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kamagawa, R. Kurane, *Analy. Scien.*, Vol. 17, **2001**, 155–160.
- [273] E. Hammersten, *Biochem. Z.* **1924**, 144, 383.
- [274] a) S. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 74, 2238–2245; b) S. Katz, *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 68, 240–253; c) C. A. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 6032 – 6034.
- [275] W. Bannwarth, W. Pfeleiderer, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 1991 – 1999.
- [276] a) J. S. Lee, L. J. P. Latimer, R. S. Reid, *Biochem. Cell Biol.* **1993**, 71, 162 – 168; b) E. Fusch, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7204 – 7209; c) S. S. Alexandre, J. M. Soler, L. Seijo, F. Zamora, *Phys. Rev. B* **2006**, 73, 205112.
- [277] A. Rakitin, P. Aich, C. Papadopoulos, Yu. Kobzar, A. S. Vedenev, J. S. Lee, J. M. Xu, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 86, 3670 – 3673.
- [278] a) B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, 205, 698; b) B. Rosenberg, E. Renshaw, L. van Camp, J. Hartwick, J. Drobnik, *J. Bacteriol.* **1967**, 93, 716; c) B. Rosenberg, L. van Camp, E. B. Grimley, A. Y. Thomson, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 1347; d) B. Rosenberg, L. van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1969**, 222, 385.
- [279] K. Tanaka, M. Shionoya, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 5002 – 5003.
- [280] M. Tasaka, K. Tanaka, M. Shiro, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2001**, 13, 671 – 675.
- [281] K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, M. Shionoya, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 77 – 83.

- [282] H. Cao, K. Tanaka, M. Shionoya, *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, 48, 1745 – 1748.
- [283] a) E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10714 – 10 715; b) N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, 32, 13 – 25; c) N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13684 – 13685; d) R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, 287, 755 – 758; e) S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12 364 – 12367.
- [284] a) K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8802 – 8803; b) K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12494 – 12 498; c) Y. Takezawa, K. Tanaka, M. Shionoya, *Poster- Präsentation beim COE Symposium for Young Scientists on Frontiers of Molecular Science*, August 25 – 26, **2006**, Koshiba Hall, University of Tokyo.
- [285] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3375 – 3376.
- [286] D.-L. Popescu, T. J. Parolin, C. Achim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6354 – 6355.
- [287] a) G. H. Clever, Y. S(Itl, H. Burks, W. Spahl, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 8708 – 8718; b) C. Beuck, I. Singh, A. Bhattacharya, W. Hecker, V. S. Parmar, O. Seitz, E. Weinhold, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 4088 – 4091; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3958 – 3960.
- [288] S. Akine, T. Taniguchi, T. Nabeshima, *Chem. Lett.* **2001**, 682 – 683.
- [289] G. H. Clever, K. Polborn, T. Carell, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7370 – 7374 und *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7204 – 7208.
- [290] G. H. Clever, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 254 – 257 und *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 250 – 253.
- [291] K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, 1, 190 – 194; siehe auch: J. Müller, *Nature* **2006**, 444, 698.
- [292] M. K. Johansson, R. M. Cook, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3466-3471; b) W. Tan, K. Wang and T. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 547.
- [293] W. Tan, K. Wang, T. J. Drake, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 547-553.
- [294] a) J. Gao, S. Watanabe, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 12748- 12749; b) J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E.T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 11590- 1159.
- [295] a) J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 277-280, b) M.D. Sorensen, M. Petersen and J. Wengel, *Chem Commun.*, **2003**, 1, 2130-2131.
- [296] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3375-3376.
- [297] C. Brotschi, G. Mathis, C. J. Leumann, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1911-1923.
- [298] M. D. Sorensen, M. Petersen, J. Wengel, *Chem. Commun.* **2003**, 2130-2131.

- [299] K. Yamana, R. Iwase, S. Furutani, H. Tsuchida, H. Zako, T. Yamaoka, A. Murakami *Nucl. Acids Res.* **1999**, 27, 2387-2392.
- [300] H. Asanuma, K. Shirasuka, T. Takarada, H. Kashida, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (8), 2217-2223.
- [301] a) S. M. Langenegger, R. Häner, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 9273-9276; b) V. L. Malinovski, F. Samain, R. Häner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4464-4467
- [302] E. Mayer-Enthart, C. Wagner, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron* **2007**, 63, 3434-3439.
- [303] E. Mayer-Enthart und H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 3451–3453.
- [304] J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 2088–2090.
- [305] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4128-4158.
- [306] C. M. Niemeyer, M. Adler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 3779-3783.
- [307] T. Carell, C. Behrens, J. Gierlich, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2221-2228.
- [308] J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, *Chem. Commun.* **2005**, 1939-1949.
- [309] F. J. M. Hoeben, P. Jonkheijm, E. W. Meijer, A. P. H. J. Schenning, *Chem. Rev.* **2005** 105, 1491-1546.
- [310] K. C. Hannah, B. A. Armitage, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 845-853.
- [311] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2865-2869.
- [312] M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 3179-3183.
- [312] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 603-606.
- [313] M. Endo, N. C. Seeman, T. Majima, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 6074- 6077.
- [314] B. Ding, R. Sha, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (33), 10230-10231.
- [315] D. Baumstark, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2652–2654.
- [316] Elke Mayer-Enthart, Darstellung und Untersuchung von Modellsystemen für den Ladungstransfer in DNA und zwischen Peptiden und Oligonukleotiden, TU München **2007**.
- [317] G. H. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 6240-6350.
- [318] L. J. P. Latimer, J. S. Lee, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 13849-13581.
- [319] G. Kokkinidis, A. Kelaidopoulou, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 414, 197- 208.
- [320] N. C. Chaudhuri, R. X.-F. Ren, E. T. Kool, *Synlett* **1997**, 4, 341- 347.
- [321] a) R. I. Cukier, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 16101–16115; b) R. I. Cukier, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 2377 – 2381; c) X. G. Zhao, R. I. Cukier, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 945 – 954; d) R. I. Cukier, D. G. Nocera, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49, 337 – 369; e) R. I. Cukier, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 15428–15443; f) R. I. Cukier, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 1746 – 1757; g) R. I. Cukier, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1655, 37 – 44.

- [322] Trifonov, A., Raytchev, M., Buchvarov, I., Rist, M., Barbaric, J., Wagenknecht, H.-A., Fiebig, T.; *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 19490-19495.
- [323] M. A. Fox, M. Chanon, *Photoinduced Electron transfer. Part A. Conceptional Basis*. Elsevier: Amsterdam, 1988.
- [324] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051-2054.
- [325] S. Matsuda, A. A. Henry, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 6134-6139.
- [326] a) D. Guianvarc'h, R. Benhida, J.-L. Fourrey, *Tetrahedron Lett.* 2001, *42*, 647-650; b) D. Guianvarc'h, J.-L. Fourrey, M.-E. T. H. Dau, V. Guérineau, *J. Org. Chem.* 2002, *67*, 3724-3732.
- [327] M. Yokoyama, H. Toyoshima, M. Shimizu, H. Togo, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1997, 29-33.
- [328] T. H. Dinh, M.-J. Bayard, J. Igolen, *C. R. Acad. Sc. Paris* **1976**, 283, 227-228.
- [329] N. S. Girgis, H. B. Cottam, R. L. Robins, *J. Heterocyclic Chem.* **1988**, 25, 361-366.
- [330] M. Cornia, G. Casiraghi, L. Zetta, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5466-5468.
- [331] J. S. Lai, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3040-3041.
- [332] T. N. Sokolova, I. V. Yartseva, M. N. Preobrazhenskaya, *Carbohydr. Res.* **1981**, 93, 19-34.
- [333] M. Yokoyama, M. Nomura, T. Tanabe, H. Togo, *Heteroatom Chem.* **1995**, 6, 189-193; b) M. Yokoyama, M. Nomura, H. Togo, H. Seki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 2145-2149; c) W. Hei, H. Togo, M. Yokoyama, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5541-5544; d) W. Hei, H. Togo, Y. Waki, M. Yokoyama, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 2425-2433.
- [334] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndt, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.*, **2008**, *in press*, DOI: 10.1021/jo8004793.41.
- [335] a) J. A. Rojas, E. Kervio, C. Deck, C. Richert, *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* **2007**, 4, 784-802.
- [336] a) R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 2, 565; b) V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.